

Etablierung von Testverfahren zur Evaluation niedermolekularer Modulatoren des Wnt-Signalwegs und anderer biologischer Prozesse

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie
der Universität Dortmund
angenommene

Dissertation

von
Diplom Biochemiker
Bernhard Ellinger
aus Ollendorf

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Roger Goody

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2010

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und an der Technischen Universität Dortmund in der Zeit von August 2005 bis Juli 2010 angefertigt.

Si nous ne trouvons pas des choses agréables,
nous trouverons du moins des choses nouvelles.

Wenn wir schon nichts Schönes finden,
so finden wir zumindest etwas Neues.

Candide, ou l'Optimisme

Voltaire

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung in ausgewählte Aspekte der Chemischen Biologie	1
1.2 Erläuterung der biologischen Themengebiete dieser Arbeit	8
1.2.1 Bekämpfung bakterieller Infektionen	8
1.2.2 Der kanonische Wnt-Signalweg	11
1.2.3 Der nicht-kanonische Wnt/Ca ²⁺ -Signalweg	15
1.2.4 Der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg	17
2. Zielsetzung der Arbeit	21
3. Material	23
3.1 Laborgeräte	23
3.2 Verbrauchsmaterialien	25
3.3 Chemikalien und Reagenzien	25
3.4 Puffer und Lösungen	26
3.5 Nährmedien	30
3.5.1 Nährmedien für die Zellkultur	30
3.5.2 Nährmedien für die Bakterienkultur	31
3.6 Biologisches Material	31
3.6.1 Eukaryontische Zelllinien	31
3.6.2 Bakterienstämme	32
3.7 Enzyme und Kit-Systeme	33
3.8 Protein- und DNA-Standards	33
3.8.1 Proteinstandards	33
3.8.2 DNA-Standards	33
3.9 Oligonukleotide	33
3.10 Antikörper	34
3.10.1 Erstantikörper	34
3.10.2 Markierte Zweitantikörper und Naturstoffe	35
4. Methoden	36
4.1 Molekularbiologische Methoden	36
4.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien	36
4.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung	37
4.1.3 Erzeugung bakterieller Kryokulturen	37
4.1.4 Polymerasekettenreaktion	37
4.1.5 DNA-Gelelektrophorese	38
4.1.6 Restriktionsspaltung	38
4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten	39
4.1.8 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
4.1.9 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
4.1.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten	40

4.1.11 Bestimmung des intrazellulären pH-Werts von Bakterienzellen	41
4.1.12 Antibakterielle Assays	42
4.1.13 Bestimmung der Zellwandintegrität einer Bakterienzelle	43
4.2 Zellbiologische Methoden	43
4.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	43
4.2.2 Bestimmung der Zellzahl	44
4.2.3 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	44
4.2.4 Auftauen eukaryontischer Zellen	44
4.2.5 Bestimmung der Zytotoxizität einer chemischen Verbindung.	45
4.2.6 Anfärbemethoden für die Mikroskopie	46
4.2.7 Herstellung von Wnt3a- und L-Zell-Medium	48
4.2.8 Luziferasebasierte Messung der Wnt-Aktivität	48
4.2.9 Immobilisierung von Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen	49
4.3 Proteinbiochemische Methoden	49
4.3.1 Herstellung von Zelllysaten	49
4.3.2 Herstellung von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten	50
4.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von M. Bradford	50
4.3.4 SDS-Gelelektrophorese	51
4.3.5 Immunodetektion von Proteinen	51
4.3.6 Entfernen gebundener Antikörper von einer PVDF-Membran	52
4.3.7 Affinitätsaufreinigung mittels biotinylierter Substanz	52
5. Ergebnisse	55
5.1 Auswahl eines Testsets verschiedenartiger Verbindungen	55
5.1.1 Erstellung einer Auswahl von Verbindungen für die Testung in verschiedenen zellulären Systemen	55
5.1.2 Validierung der Auswahl mittels vorhandener Daten	59
5.2 Einsatz des Testsets zur Identifizierung neuer antibiotischer Verbindungen	60
5.2.1 Suche nach mikrobiell wirksamen Verbindungen gegen <i>Escherichia coli</i>	65
5.2.2 Suche nach mikrobiell wirksamen Verbindungen gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
5.2.3 Suche nach mikrobiell wirksamen Verbindungen gegen <i>Acinetobacter baumannii</i>	66
5.2.4 Suche nach mikrobiell wirksamen Verbindungen gegen <i>Staphylococcus aureus</i>	67
5.3 Einsatz des Testsets zur Identifizierung von Modulatoren des Wnt-Signalwegs	72
5.3.1 Entwicklung eines phänotypischen Tests des Wnt-Signalwegs	73
5.3.2 Entwicklung eines Reporter-gen-basierten Tests des Wnt-Signalwegs	78
5.3.3 Einsatz des Reporter-gen-Tests zur Identifizierung von Modulatoren des Wnt-Signalwegs	82
5.3.4 Untersuchung eines Inhibitors des Wnt-Signalwegs	84
5.3.5 Untersuchung von Aktivatoren des Wnt-Signalwegs	89
5.4 Weitere wissenschaftliche Projekte	103
5.4.1 Immobilisierung lebender Zellen auf Oberflächen	103
5.4.2 Untersuchung von Thiopeptid-Antibiotika	104
5.4.3 Untersuchung einer Bibliothek Chondramid- und Jaspamid-ähnlicher Verbindungen	106

5.4.4 Klonierung einer Fluoreszenzsonde zur Untersuchung der intrazellulären Proteinverteilung	108
6. Diskussion	110
<i>6.1 Beurteilung der repräsentativen Substanzauswahl</i>	<i>110</i>
<i>6.2 Bewertung der Antibiotikatests</i>	<i>113</i>
<i>6.3 Evaluation der Untersuchungen des Wnt-Signalwegs</i>	<i>116</i>
7. Zusammenfassung der Arbeit	127
8. Anhang	132
<i>8.1 Daten zur Struktur-Wirkungsbeziehung der Oxepan Bibliothek</i>	<i>132</i>
<i>8.2 Vollständige Liste der identifizierten humanen Proteine</i>	<i>139</i>
<i>8.3 Vollständige Liste der Zytotoxizitätsdaten der Chondramid und Jaspamid ähnlichen Verbindungen</i>	<i>143</i>
9. Literaturverzeichnis	146
10. Abkürzungsverzeichnis	164
11. Danksagung	167
12. Eidesstattliche Erklärung	169

1. Einleitung

1.1 Einführung in ausgewählte Aspekte der Chemischen Biologie

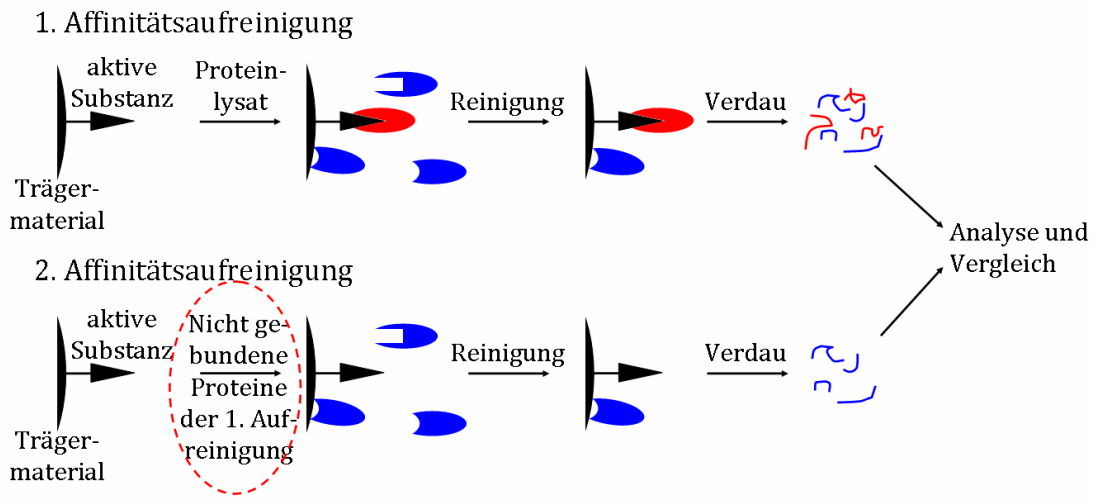
Die Chemische Biologie ist eine Wissenschaft an den Grenzen von Chemie und Biologie, mit deren Hilfe versucht wird, molekulare Zusammenhänge der Biologie durch chemische Ansätze zu erkennen.[1] Die Ursprünge dieser Wissenschaft finden sich im 19. Jahrhundert. Bereits zu dieser Zeit wurden chemische Verbindungen eingesetzt, um biologische Effekte aufzuklären. Dies führte zur Frage, was der Zusammenhang zwischen den physikochemischen Eigenschaften und der Aktivität einer Substanz ist. Bereits 1868 wurde eine Verknüpfung zwischen der Löslichkeit verschiedener Salze einer Verbindung und ihrer biologischen Aktivität aufgestellt.[2] Diese Theorien wurden im Laufe der Zeit immer weiter entwickelt, bis Ferguson 1939 postulierte: „Die toxische Dosis einer Substanz ist ein konstanter Teil ihrer Wasserlöslichkeit“.[3] Das bedeutet, dass die Konzentration, die benötigt wird, um einen biologischen Effekt auszulösen, mit der Wasserlöslichkeit steigt. Dieser Zusammenhang ist allerdings nur in einem gewissen Bereich linear. Zum einen wird mit steigender Lipophilie ein Durchqueren der Zellmembran immer unwahrscheinlicher[2], und zum anderen können zum Beispiel ionisierbare Verbindungen zwei optimale ClogP-Werte besitzen, bei denen die intrazelluläre Konzentration dann ein Maximum erreicht.[2,4] Der ClogP-Wert ist der dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen einer wässrigen Phase und einer Phase aus 1-Octanol. Er wird genutzt, um die Hydrophobizität einer Verbindung als Zahl auszudrücken. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein einzelnes Kriterium, wie die Löslichkeit, allein nicht ausreicht, um die biologische Aktivität einer Substanz zu beschreiben, weshalb im Laufe der Zeit verschiedene verbesserte Modelle entwickelt wurden - von physikochemischen Modellen, welche unter anderem elektrostatische Potentiale[5] und dreidimensionale Atomabstände[6] nutzen, über chemoinformatische Modelle, die zum Beispiel Bindungsenergien vergleichen[7], bis zu pharmakologischen und chemischen Modellen. Das bekannteste pharmakologische Modell bezieht die Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung, Exkretion und Toxizität einer Verbindung im

menschlichen Körper mit ein (ADMET).[8] Unter den rein chemischen Versuchen die Bioverfügbarkeit von Substanzen vorherzusagen ist das Modell von Lipinski et al. wahrscheinlich das bekannteste.[9] Als Angestellter von Pfizer Inc. hatte er 1997 Regeln für die Entwicklung von bioverfügbaren Substanzen aufgestellt. Diese Regeln beinhalten vier Kriterien. Danach sollte eine Substanz höchstens fünf Wasserstoffbrücken-Donoren und höchstens zehn Akzeptoren besitzen, ein Molekulargewicht unter 500 g/mol und einen MlogP-Wert von unter fünf haben. Der MlogP-Wert wurde analog dem ClogP-Wert eingesetzt, da er auf einem rein mathematischen Verfahren beruht und dadurch auf alle chemischen Strukturen angewandt werden konnte, ohne weitere Experimente durchführen zu müssen. Schon in der Originalpublikation war allerdings eine Ausnahme von diesen vier Regeln für eine bioverfügbare Substanz zulässig und es wurden auch ganze Wirkstoffklassen ausgeschlossen.[9]

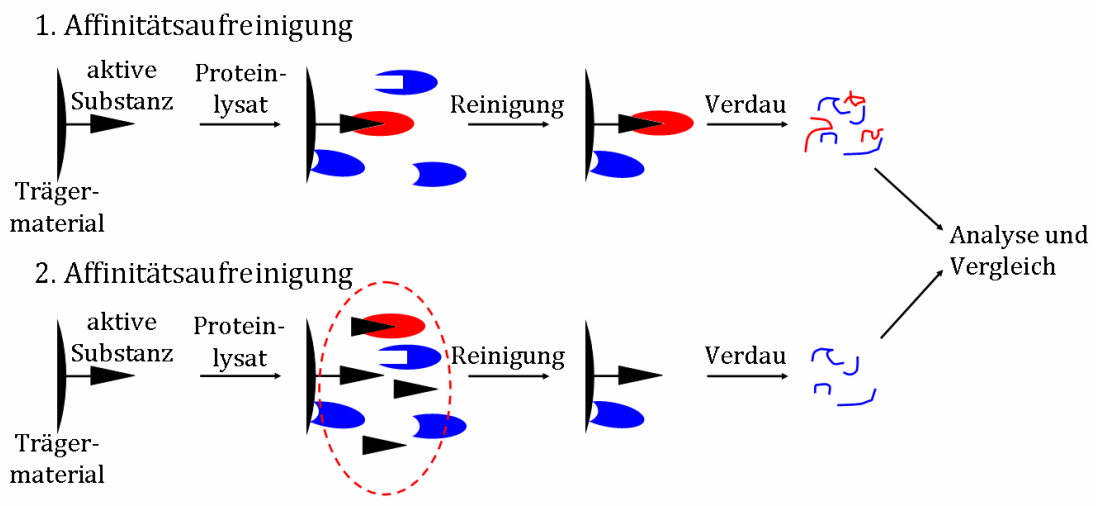
All diese Methoden wurden entwickelt, um vorherzusagen, ob eine Substanz für den Organismus verfügbar ist. Wird dann ein biologischer Effekt beobachtet, kann die Substanz für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Wurde zum Beispiel die Modulation einer Enzymaktivität gefunden, kann im nächsten Schritt untersucht werden, wie sich diese Modulation auf eine Zelle oder einen ganzen Organismus auswirkt. Man spricht dann von einem rückwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatz. Vorwärtsgerichtete Ansätze gehen von einem induzierten Phänotyp aus und versuchen dann die molekulare Ursache für diesen Effekt zu identifizieren. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten antibiotischen Tests und auch der Wnt-Reporter-Test, welche in späteren Kapiteln vorgestellt werden, verfolgen solche vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansätze. Die Herausforderung dieses Verfahren besteht darin, aus der Vielzahl möglicher Wechselwirkungen der Substanz mit zellulären Prozessen, jene zu identifizieren, die den Phänotyp hervorrufen.

Eine der Methoden, die für die Identifizierung des molekularen Ziels einer Verbindung in solch einem vorwärtsgerichteten Ansatz genutzt werden kann, ist die Affinitätsaufreinigung. Für diese Methode muss die Substanz an eine Trägermatrix gebunden werden. Diese wird dann mit zellulären Proteinen inkubiert, und mit geeigneten Puffersystemen gewaschen. Dadurch lassen sich die verbleibenden mit hoher Affinität an die Substanz bindenden Proteine reinigen, und in folgenden Untersuchungen analysieren.

Serielle Affinitätsaufreinigung



Kompetitive Affinitätsaufreinigung



Komparative Affinitätsaufreinigung

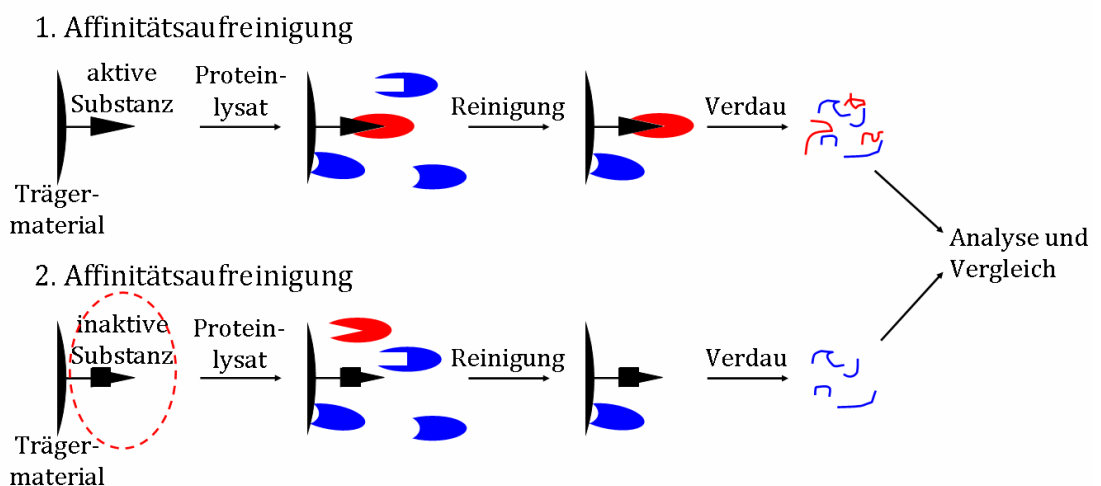


Abbildung 1: Möglichkeiten der Affinitätsaufreinigung. Der hochaffine Bindungspartner ist in rot dargestellt. Die niederaffinen Bindungspartner sind in blau dargestellt. Der für jede Methode einzigartige Schritt ist mit einer roten Ellipse verdeutlicht. Die freie aktive Substanz in der kompetitiven Affinitätsaufreinigung ist als schwarzes Dreieck dargestellt.

In der Literatur werden drei gebräuchliche Methoden der Affinitätsaufreinigung beschrieben, welche in Abbildung 1 zusammengefasst sind.[10]

In der ersten Methode der Abb. 1 wird das Proteinlysat 2-mal für eine Aufreinigung genutzt. Bei der ersten Reinigung binden hochaffine Proteine an die immobilisierte Substanz und bei der folgenden Aufreinigung sind die hochaffinen Bindpartner nicht mehr vorhanden, weshalb nur noch niederaffine und damit unspezifische Proteine identifiziert werden können. Proteine, die nur in der ersten Affinitätsaufreinigung dieser als seriell beschriebenen Methode gefunden werden, gelten als Zielproteine.[11]

Die zweite Aufreinigungsmethode wird als kompetitive Methode beschrieben. Sie vergleicht die identifizierten Proteine einer Aufreinigung in Gegenwart der ungebundenen aktiven Substanz mit einer Aufreinigung ohne die ungebundene Substanz. Die Bindungspartner sind in diesem Fall jene Proteine, die nicht in Anwesenheit der freien Substanz identifiziert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die dritte Methode, die komparative Affinitätsaufreinigung, genutzt. Bei dieser Methode wird eine Aufreinigung mit einer immobilisierten aktiven Substanz durchgeführt. Diese Aufreinigung wird mit einer Aufreinigung verglichen, bei der eine inaktive Kontrollsubstanz an die Trägermatrix gebunden war. Idealerweise sind die Kontrollverbindung und die aktive Substanz strukturell sehr ähnlich. In solch einem Fall kann angenommen werden, dass alle nur an die aktive Substanz bindenden Proteine wirkliche molekulare Ziele der Substanz sind.

Die Reinigung der bindenden Proteine ist allerdings nur der Anfang, dem immer die Identifizierung dieser Proteine folgt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um möglichst viele der Bindungspartner zu identifizieren, wobei moderne Strategien oft den Abbau des Proteins zu Peptiden und deren Analyse mittels Massenspektrometrie nutzen.[12] Dafür werden in einem ersten Schritt die Cysteine der Proteine alkyliert und anschließend mit spezifischen oder unspezifischen Proteasen gespalten.[12,13] Die direkte Analyse unveränderter Peptidgemische ist eine faszinierende Möglichkeit, da sie im Prinzip sehr einfach und kostengünstig ist.[14] Tatsächlich sind die Genauigkeit und die Sensitivität stark von den Proben abhängig, weshalb Markierungsstrategien entwickelt wurden. Eine dieser Strategien nutzt zum Beispiel isotopenmarkierte Aminosäuren (SILAC).[15] Dafür werden zwei Proteinlysate hergestellt und in

zwei parallelen Aufreinigungen eingesetzt. Eines der Lysate besteht aus Proteinen mit Aminosäuren normaler Isotopenverteilung; das andere Lysat enthält Proteine, deren Aminosäuren Arginin und Lysin teilweise aus schwerere Isotopen aufgebaut sind. Die charakteristischen Massenunterschiede der Isotope erlauben dann die sichere Zuordnung der Peptide zu einer der beiden Aufreinigungen und auch die Quantifizierung der Peptid- bzw. Proteinmengen.[15] Zudem gibt es die Möglichkeit, mittels modifizierter Protokolle Proteinmethylierungen, Bindungskonstanten und Dosis- Wirkungskurven zu bestimmen.[16,17] Andere Methoden (ITRAQ und ICAT), die ebenfalls eine Quantifizierung erlauben, inkorporieren die schweren Isotope in chemische Verbindungen, um damit entweder die Proteine oder die Peptide zu markieren.[18,19] Während die ICAT-Methode - ähnlich wie SILAC - den Vergleich zweier Proben zulässt[18], können mittels ITRAQ bis zu acht Proben parallel analysiert werden[20,21]. Es kann allerdings nicht nur das Molekulargewicht einer Verbindung, sondern auch deren veränderte physikochemische Eigenschaften zur Analyse genutzt werden. Ein Beispiel ist die COFRADIC-Technologie, welche durch hydrophobe Markierungen die veränderten Chromatographieeigenschaften eines Peptids zur Analyse nutzt, wobei auch N-terminale Proteinmodifikationen identifiziert werden können.[22] All die oben beschriebenen Methoden und Analysen benötigen eine chemisch modifizierte aktive Verbindung. Wenn dies nicht möglich ist, da die Substanz z. B. durch Modifikation inaktiviert wird oder keine geeigneten Ankergruppen für Modifikationen vorhanden sind, können diese Aufreinigungen nicht durchgeführt werden. In diesen Fällen muss das molekulare Ziel der Verbindung mit anderen Technologien aufgeklärt werden. Eine Möglichkeit wäre dann das „Haploinsufficiency Profiling“, welches in Abbildung 2 dargestellt ist.[23]

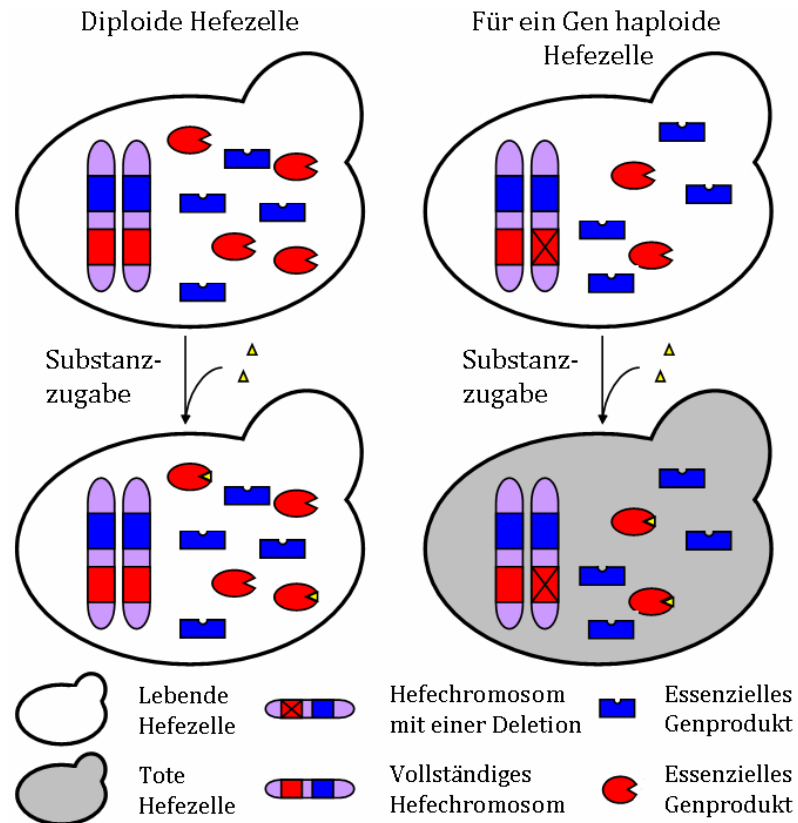


Abbildung 2: Darstellung des „Haploinsuffizienz Profiling“. Durch das Ausschalten eines der zwei Allele eines essenziellen Gens wird die korrespondierende Proteinmenge reduziert. Diese Zelle wird sensitiver gegenüber Störungen dieses Proteins. Bei gleicher Konzentration einer Substanz, die die Funktion dieses Proteins beeinträchtigt, stirbt die haploide Zelle bereits, während die Diploide noch überlebensfähig ist.

Der Vorteil dieser Methode ist die einfache Analyse.[23] Betroffene Zellen können nicht in Anwesenheit der Substanz überleben. Dieses Prinzip wurde vielfach angepasst, und so gibt es auch Hefezellen, welche jeweils ein Gen überexprimieren.[24] Diese Überexpressionsstämme sollten bei Substanzkonzentrationen überlebensfähig sein, bei denen Wildtypstämme nicht mehr wachsen. In Anlehnung an die Stämme mit veränderten Proteinmengen kann man auch das Metabolom[25] oder Transkriptom[26] in Wildtypstämmen untersuchen. Bei Verlust aktiver Enzyme sammeln sich charakteristische Metabolite in der Zelle an, und die Zelle wird versuchen, ihr Transkriptom dementsprechend anzupassen, um diesen Mangel zu beheben.

Eine Methode, die die einfache Analyse der Ergebnisse der oben beschriebenen hefeogenetischen Ansätze mit den Affinitätssonden kombiniert, ist der Hefe-3-Hybrid Ansatz (Abb. 3).[27]

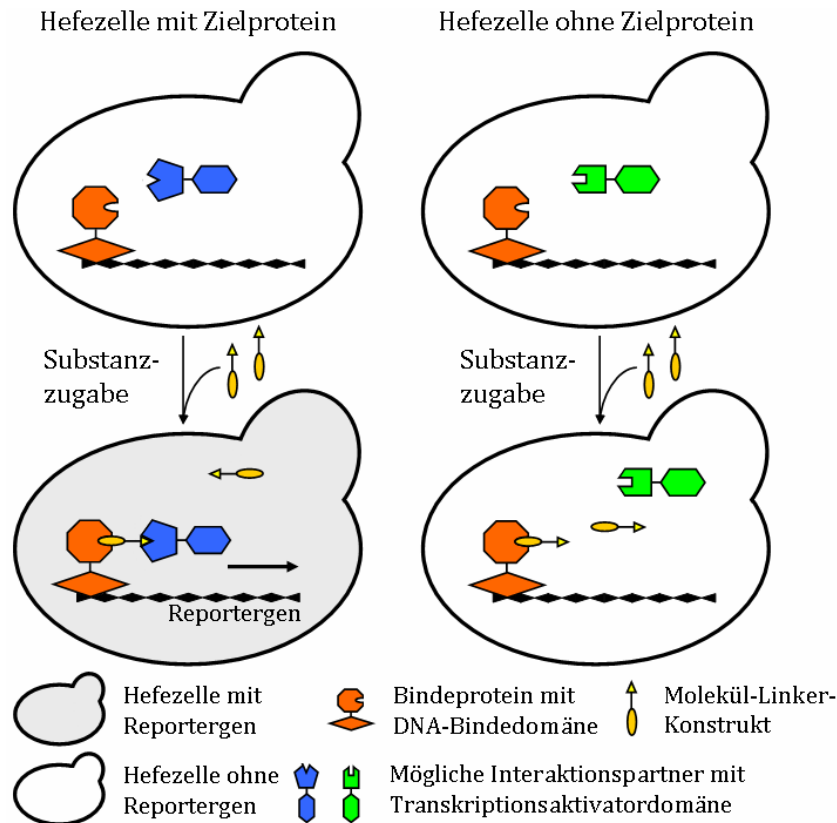


Abbildung 3: Darstellung der Hefe-3-Hybrid Technologie. Fusionsproteine sind durch eine einheitliche Farbgebung gekennzeichnet. Das Molekül-Linker-Konstrukt besteht aus der zu untersuchenden Substanz, die mittels eines Linkers mit einem bekannten Bindepartner verbunden ist. Die DNA-Bindedomäne ist an ein Protein fusioniert, welches hochaffin an diesen Bindepartner bindet. Beispiele sind FK506 und FKBP oder Folsäure und DHFR.[10,27] Wenn sich alle Proteine durch die Verbindung in räumlicher Nähe zueinander befinden, findet die Transkription eines Reportergens statt, was durch einen Pfeil dargestellt ist. Dieses Reportergen vermittelt eine Enzymaktivität, wobei üblicherweise Galaktosidase genutzt wird, was auf entsprechenden Medien zu einer Blaufärbung der Hefekolonie führt.[27]

Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die relativen Proteinmengen in der Zelle keinen Einfluss auf das Ergebnis haben. Bei herkömmlichen Affinitätsaufreinigungen kann es dazu kommen, dass sehr schwach exprimierte Proteine nicht detektiert werden oder in der Analyse als wenig wahrscheinlicher Bindungspartner entfernt werden. Um dieses Problem zu umgehen, gibt es verschiedene Methoden, welche jedoch alle zwei Gemeinsamkeiten aufweisen. Die Methoden beginnen zum einen immer mit einem homogenen Proteingemisch, d. h., alle Proteine sind ungefähr gleich häufig vertreten, und zum anderen findet im Zuge der Aufreinigung eine Amplifikation der Proteine oder entsprechender Marker statt, die an die Substanz binden. Eine der Methoden nutzt genetisch modifizierte Phagen.[28] Diese Phagen tragen humane Proteine oder deren

Fragmente auf ihren Capsidproteinen und können dadurch in Affinitätsaufreinigungen eingesetzt werden. Die Amplifikation findet in Bakterien statt und die aus den Bakterien erhaltenen vermehrten Phagen können für weitere Affinitätsaufreinigungen mit derselben Affinitätssonde eingesetzt werden, bis nach mehreren dieser Runden nur noch einige wenige hochaffine Proteine enthalten sind und identifiziert werden können.[28] Ganz ähnlich arbeitet die „mRNA display“-Technologie.[10] Die Proteinexpression findet hier *in vitro* statt und die Amplifikation geschieht über eine PCR.

Die vorgestellten Methoden haben alle dasselbe Ziel, nämlich den Nachweis des durch eine Substanz beeinflussten Proteins. Welche der Methoden für den jeweiligen Einsatz am geeignetsten ist, muss allerdings von Fall zu Fall entschieden werden.

Auch wenn diese Einführung in das Gebiet der Chemischen Biologie auf die Auswahl biologisch aktiver Verbindungen und die Identifizierung der Bindungspartner dieser niedermolekularen Substanzen beschränkt bleiben muss, erstreckt sich die Chemische Biologie heutzutage über alle Bereiche der Biologie. Weitere Beispiele werden in den Kapiteln 3 und 4 sowie in verschiedenen Übersichtsartikeln[29-31] und Büchern [32,33] dargestellt.

1.2 Erläuterung der biologischen Themengebiete dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden verschiedene biologische Fragestellungen bearbeitet. Die Suche nach neuen Antibiotika und die Untersuchung von Modulatoren des Wnt-Signalwegs stellen die Schwerpunkte dieser Arbeit dar. Aus diesem Grund sollen diese Themengebiete im Folgenden näher erläutert werden, wohingegen die vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Untersuchungen der ebenfalls untersuchten biologischen Prozesse in den jeweiligen Kapiteln eingeführt werden (Kap. 5.4.1 und 5.4.4).

1.2.1 Bekämpfung bakterieller Infektionen

Auch wenn der ehemalige Surgeon General of the United States W. H. Stewart, zu seiner Zeit ranghöchster Berater des Staates in Gesundheitsfragen,

fälschlicherweise mit den Worten zitiert wird, „dass es nun Zeit ist, das Kapitel der Infektionskrankheiten für beendet zu erklären“ („it is time to close the book on infectious diseases“), zeigt es doch, welche Einstellung 1967 vorherrschte.[34] Nachdem bis 1962 sieben verschiedene Antibiotikaklassen entdeckt wurden, dauerte es 38 Jahre, bis eine weitere Klasse vermarktet wurde.[35] Für diese Lücke gibt es mehrere Gründe. Verglichen mit anderen, insbesondere chronischen Krankheiten werden Antibiotika nur über einen kurzen Zeitraum genutzt und ihr Einsatz ist auch noch meist auf wenige bestimmte Infektionsarten beschränkt, welche zum Teil in der entwickelten Welt verhältnismäßig selten sind.[35,36] Diese Einschränkung reduziert zwar den Kreis der Anwender, aber es ist oft die einzige Möglichkeit die Überlegenheit eines neuen Antibiotikums zu demonstrieren.[36] Für eine Zulassung in den USA muss generell gezeigt werden, dass neue Medikamente Vorteile gegenüber bestehenden Therapien besitzen. Es ist aber schwer, in einer Studie den Vorteil eines Antibiotikums zu zeigen, welches beispielsweise ein geringeres Risiko trägt, Resistenzen zu erzeugen als herkömmliche Antibiotika. Bei einem direkten Vergleich sind das herkömmliche und das neuartige Antibiotikum nahezu gleich effektiv, da sich der Vorteil der Resistenzarmut erst über einen längeren Zeitraum auswirkt.[36] Die Entstehung von Resistenzen, d. h. Unempfindlichkeiten eines Bakterienstamms gegen ein bestimmtes Antibiotikum oder gegen eine ganze Klasse von Antibiotika, stellt ein großes Risiko dar. Tritt zum Beispiel bei einem Patienten während der Behandlung einer Pseudomonasinfektion eine Resistenz gegen das genutzte Antibiotikum auf, erhöht sich seine Sterberate um das 3-fache, seine Wahrscheinlichkeit, sich eine weitere Infektion zuzuziehen, verzehnfacht sich, die Dauer seines Klinikaufenthalts verdoppelt sich und es kommen zusätzliche Kosten in Höhe von ungefähr 12.000 \$ auf das Gesundheitssystem zu.[37] Diese für die USA bestimmten Zahlen sind durchaus auch für Europa relevant, wenn man bedenkt, dass 10% aller Pseudomonaden während der Therapie Resistenzen entwickeln.[37,38] Die Entwicklung von Resistenzen im Krankenhaus stellt aber nur einen Aspekt dar. So werden Antibiotika wegen ihrer wachstumsfördernden Eigenschaften in großen Mengen in der Tierzucht eingesetzt.[39] In den USA werden Schätzungen zufolge 50 bis 70% aller Antibiotika für die Tierzucht genutzt[36], und auch in Europa waren die Zahlen in der Vergangenheit ähnlich. In den Niederlanden wurden 1996 1.500 kg Vancomycin zur Therapie von

Patienten eingesetzt, während gleichzeitig 80.000 kg Avoparin, ein Vancomycin-Analogon, in der Tiermast genutzt wurden.[40] Die geringen Dosen, welche in der Tiermast eingesetzt werden, fördern die Entwicklung von Resistenzen, und so wurden im gleichen Zeitraum in den Niederlanden auf 80% der rohen Geflügelfleischprodukte Vancomycin-resistente *Enterococci* (VRE) nachgewiesen.[41] Um zu verhindern, dass eine Übertragung der Bakterien auf den Menschen stattfindet und dass die Resistenzen zwischen verschiedenen Bakterienstämmen ausgetauscht werden - beides bereits beobachtete Phänomene[42,43] - wurden gesetzliche Maßnahmen ergriffen. Schweden und Dänemark verboten 1986 bzw. 1999 den Einsatz aller Antibiotika als Wachstumsförderer[40,44]; in der gesamten EU wurden in den folgenden Jahren mehrere Antibiotikaklassen verboten[44], und auch die amerikanische Aufsichtsbehörde FDA reagierte im Juli 2005 mit dem ersten Verbot eines Antibiotikums.[36] Um den Einsatz von Antibiotika für Masttiere in der EU weiter zu reduzieren, wird sogar über Impfprogramme nachgedacht.[45]

Die Entwicklung von Resistenzen stellt in hochentwickelten Ländern der ersten Welt allerdings nur ein teures und behandlungsintensives Problem dar. In den unterentwickelten Ländern wird solch ein Problem lebensbedrohlich. In Mosambik, einem durchschnittlich reichen Land Afrikas, gemessen am Bruttoinlandsprodukt[46], standen 1988 für die Behandlung sexuell übertragbarer Krankheiten für jeden Patienten 0,13 \$ für das gesamte Jahr zur Verfügung[47]. Dies macht deutlich, dass in diesen Ländern nur günstigste Antibiotika eingesetzt werden können. Durch diese geringe Auswahl an einsetzbaren Antibiotika sind Resistenzen besonders häufig und oft schwer zu therapieren.[47-49] Ein besonders drastisches Beispiel bietet das intrazelluläre Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*, mit dem ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert ist.[50] Bricht die Infektion aus, kommt es zum Krankheitsbild der Tuberkulose, die generell aber gut heilbar ist.[50] Da die Therapie mit vier verschiedenen Antibiotika aber sechs bis acht Monate dauert, stellt sie eine logistische Herausforderung für die weniger entwickelten Länder dar.[51] So entstand eine multiresistente Tuberkuloseform (MDR TB), deren bis zu zwei Jahre dauernde Behandlung 3- bis 100-mal so teuer ist.[52] Multiresistente Tuberkulosestämme, d. h. Bakterien, die gegen die gebräuchlichsten beiden Antibiotika Isoniazid und Rifampizin resistent sind, machen mittlerweile 5% der

jährlichen Neuinfektionen aus.[52] 2005 traten erstmals extrem resistente Tuberkulosefälle auf (XDR TB; englisch: „extensively drug resistant tuberculosis“), welche nicht nur gegen Rifampizin und Isoniazid, sondern auch gegen zwei weitere sog. Reservemedikamente (englisch: „second line drugs“) resistent waren. Ein Drittel aller HIV-positiven Patienten ist gleichzeitig mit Tuberkulose infiziert.[51] Für diese Patienten stellen MDR TB und XDR TB eine tödliche Gefahr dar. Bei einem Ausbruch von XDR TB unter 52 HIV-positiven Patienten in einer Region Südafrikas starben alle Patienten im Durchschnitt 16 Tage nach dem Stellen der Diagnose.[53] Bedenkt man gleichzeitig, dass die effektivsten Tuberkulosemedikamente Rifampizin und Isoniazid vor mehr als 40 Jahren entwickelt wurden, wird deutlich, wie dringend neue Antibiotikaklassen benötigt werden.[54] Trotz der kürzlich erzielten Fortschritte in der Behandlung bakterieller Infektionen durch chemische Verbindungen[35,54] und Antikörper[55] ist der Forschungsbedarf noch gewaltig, um sichere, billige und weltweit verfügbare Medikamente zu erhalten. So wird es wohl auch in absehbarer Zeit ein Wunschtraum bleiben, dass das Kapitel der Infektionskrankheiten für beendet erklärt werden kann.

1.2.2 Der kanonische Wnt-Signalweg

Vor 500 Millionen Jahren, im Erdzeitalter des Kambriums, gab es einen sprunghaften Anstieg in der Vielfalt tierischen Lebens. Dieser wurde begünstigt durch die damalige Lage der Kontinente nahe des Äquators und den steigenden Meeresspiegel, was zusammen zur Bildung warmer Flachwasserschelfe führte.[56] Zu dieser Zeit oder möglicherweise schon 50 Millionen Jahre früher entstanden die ersten Nesseltiere (lateinisch: *Cnidaria*), zu denen auch die bis zum heutigen Tag existierenden Süßwasserpolyphen und Seeanemonen gehören.[57] Trotz ihres einfachen Körperbaus - sie haben nur zwei Keimblätter und nur eine Körperachse - nutzten sie zur Organisation und Entwicklung ihrer Organe und Körperteile den gleichen Signalweg wie Säugetiere.[58] Dieser Signalweg ist der Wnt-Signalweg, benannt nach seinem parakrinen aktivierenden Protein (Kap. 3.3.1).[59] Genaugenommen gibt es nicht einen Wnt-Signalweg, sondern es handelt sich um mindestens drei verschiedene Signalwege, welche je nach Gewebe oder Zellverband unterschiedlich miteinander in Wechselwirkung

stehen. Der bestuntersuchte dieser Wege ist der β -Catenin-abhängige, sogenannte kanonische, Signalweg, der auch im Folgenden näher erläutert wird. Bei den beiden nicht-kanonischen Wegen handelt es sich um den kalziumabhängigen Wnt-Signalweg und den planaren Zellpolaritätssignalweg (PCP; englisch: „planar cell polarity“), die in Kapitel 1.2.3 und 1.2.4 vorgestellt werden.

Aktiviert wird der Signalweg durch die Bindung des Signalmediators an den Rezeptor. Als Mediator tritt die Familie der Wnt-Proteine auf, von denen bei Menschen 19 Mitglieder in zwölf Unterfamilien bekannt sind.[60] Erstaunlicherweise fehlt bei den Cnidariern nur die Wnt9-Unterfamilie, das bedeutet, dass elf der zwölf Unterfamilien schon vor 500 Millionen Jahren vorhanden waren. Zusätzlich zu diesen elf mit dem Menschen homologen Unterfamilien besitzen Nesseltiere noch eine weitere Unterfamilie, welche beim Menschen fehlt, aber bei Insekten, wie zum Beispiel der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, vorhanden ist. Die Fruchtfliege ist ebenfalls wie die Nesseltiere ein Modellsystem für die Erforschung von Entwicklungsprozessen, jedoch besitzt sie nur sechs der zwölf im Menschen vorkommenden Unterfamilien.[60] Das Beispiel der Familie der Wnt-Proteine macht deutlich, wie komplex die Unterschiede zwischen den Organismen sind. Aus diesem Grund soll im Folgenden soweit es möglich ist, der Zustand im menschlichen Organismus beschrieben werden.

Die 19 humanen Wnt-Proteine sind Monomere und besitzen 22 konservierte Cysteine. Das erste Cystein (Aminosäure Nummer 77) ist palmitoyliert, und die anderen Cysteine sind wahrscheinlich durch Disulfidbrücken verknüpft.[61,62] Der Lipidrest ist essenziell für die Funktion, die korrekte N-Glykosylierung und den Transport der Proteine. Durch ihre geringe Wasserlöslichkeit wirken Wnt-Proteine nur auf die 20 bis 30 angrenzenden Zellen, wobei der Transport vermutlich sowohl über aktive wie auch passive Prozesse stattfindet.[62]

Wnt-Proteine binden an ihre „Frizzled“ (Fzd) genannten Rezeptoren hochaffin durch die N-terminale CRD-Domäne.[62] Die zehn im Menschen vorhandenen Frizzled-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) mit sieben Transmembranregionen; sie haben unterschiedliche Affinitäten gegenüber den Wnt-Proteinen und funktionieren sowohl als Monomere als als Homo- oder Heterodimere.[63,64] Verdrängungsexperimente mit freien CRD-Domänen von Fzd5, 7 und 8 zeigen einen IC_{50} -Wert für das Wnt3a Protein von 2,0, 2,2 und 1,2 nM, und in Zellexperimenten reichte eine Konzentration von 0,5 nM Wnt3a-

Protein zur halbmaximalen Aktivierung des Signalwegs.[65] Die CRD-Domäne (englisch: „cysteine rich domain“) trägt ihren Namen aufgrund von zehn konservierten Cysteinen in ihrer Sequenz. Interessanterweise bindet diese Domäne auch das Amyloid- β -Protein, welches zum einen eine Rolle als Aktivator der Synapsenaktivität spielt, und zum anderen als Ursache für die Alzheimer Erkrankung vermutet wird.[66,67] Inwieweit die Bindung zum Krankheitsbild des Morbus Alzheimer beiträgt, ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht. Ebenfalls sehr wenig erforscht ist eine direkte Signalwirkung des Frizzled5-Rezeptors in Nervenzellen. Erste Studien vermuten, dass ein 8 kDa schweres, durch Proteolyse des internalisierten Rezeptors entstehendes C-terminales Fragment in den Kern wandert und dort Signalwirkung besitzt. Dieser sogenannte „Frizzled Nuclear Import Pathway“ muss allerdings noch genauer untersucht werden, da bisher nur wenige allgemeine Fakten bekannt sind.[68] Sehr gut erforscht ist hingegen die Rolle der Frizzled-Rezeptoren im kanonischen wnt-Signalweg. Ein C-terminales Lys-Thr-X-X-X-Trp-Motiv ist essenziell für die Aktivität, in dem es nach Aktivierung des Rezeptors wahrscheinlich die Bindung zu G-Proteinen der $G_{\alpha 0}$ -Familie vermittelt.[69] Zwei dieser G-Proteine, GRK5 und 6, phosphorylieren im nächsten Schritt der Signalkaskade die Korezeptoren LRP5 oder 6.[70] LRP5 und 6 sind ebenfalls integrale Membranproteine, welche möglicherweise unterschiedliche Funktionen besitzen; das jedenfalls legen die unterschiedlichen Phänotypen von LRP5- und 6-knock out- Mäusen nahe.[71] Der aktive Frizzled-Rezeptor rekrutiert außerdem das cytoplasmatische Protein Dishevelled (Dsh).[72] Im menschlichen Organismus gibt es drei Dishevelled-Proteine, Dvl1, Dvl2 und Dvl3 mit teilweise überlagernden aber noch nicht vollständig geklärten Aufgaben. Dsh wird an der Membran durch Phosphorylierung aktiviert und polymerisiert dadurch - ein einmaliger Vorgang, verglichen mit anderen Signalwegen.[73] Diese Dsh-Polymere interagieren mit einer Vielzahl von Proteinen; unter anderem binden sie die Kinasen GSK-3 β und CK1 sowie das Protein Axin, welches durch Dsh rekrutiert an den phosphorylierten Korezeptor LRP5 oder LRP6 bindet.[74,75] Die beiden Kinasen phosphorylieren LRP5 und 6 an weiteren Aminosäuren und stabilisieren dadurch die Bindung von Axin, gleichzeitig wird der Abbau von Axin durch diesen Prozess gesteigert.[76] Axin hat eine wichtige Aufgabe im Wnt-Signalweg. Ist der Signalweg nicht aktiviert, bildet es zusammen mit dem Protein APC ein

Grundgerüst für einen Proteinkomplex. Dieser Komplex besteht aus einer Vielzahl von Proteinen von denen die Proteine GSK-3 β , CK1 und β -Catenin die wichtigsten sind.[76] Bei nicht aktiviertem Signalweg phosphoryliert CK1 β -Catenin an Ser 45.[77] Dieses monophosphorylierte Protein ist das Substrat für die Kinase GSK-3 β , die β -Catenin an mehreren zusätzlichen Stellen phosphoryliert, was dazu führt, dass das Protein von E3-Ubiquitin Ligasen gebunden und ubiquitiniert wird, was letztendlich zu seinem proteasomalen Abbau führt.[76,78]

Wie oben beschrieben zerfällt der Proteinkomplex nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs, da die Proteine Axin, GSK-3 β und CK1 an die Membran rekrutiert werden, wo Axin β -Catenin zwar noch bindet, aber es nicht mehr phosphoryliert wird.[79] Ohne den ständigen Abbau akkumuliert β -Catenin deshalb im Zytoplasma und letztendlich auch im Kern. Dort bindet es an eines der vier Proteine der Familie der TCF/Lef Transkriptionsfaktoren. Durch die Bindung verdrängt β -Catenin den Repressor TLE, dessen homologes Protein Groucho aus *D. melanogaster* weit bekannter ist, und induziert die Transkription von Zielgenen.[80] Dieser Prozess ist aber stark kontextabhängig. So wurden zum Beispiel auch Zielgene identifiziert, die durch Aktivierung des Signalwegs reprimiert werden[81], und es sind transkriptionelle und posttranslationale Modifikationen einzelner Mitglieder der TCF/Lef Familie bekannt, die ebenfalls die Transkriptionsstärke modulieren.[80] Aber auch weitere Proteinpartner wie zum Beispiel das bereits erwähnte Dishevelled (Dsh) oder der Repressor CtBP regulieren den Signalweg auf dieser Ebene.[74] Zusammenfassend gibt Abb. 4 einen Überblick über die grundlegenden Schritte des Signalwegs.

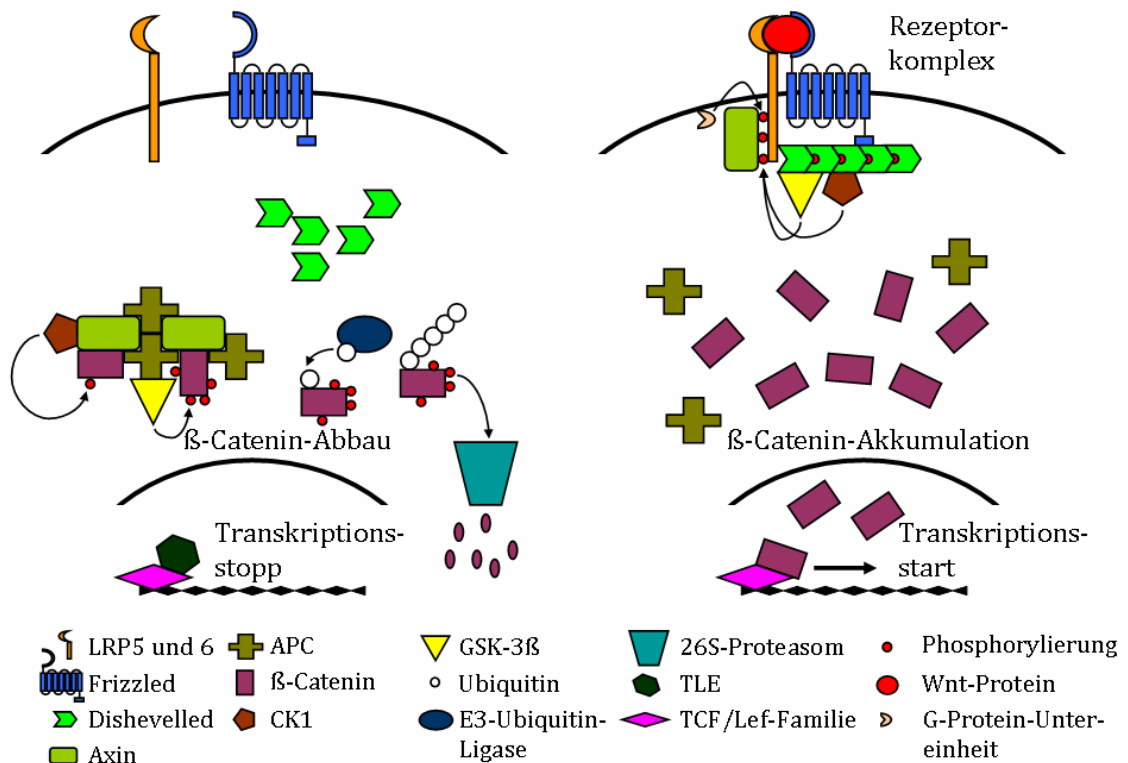


Abbildung 4: Übersicht über den Wnt-Signalweg. Dargestellt sind nur einige ausgewählte Interaktionen.

1.2.3 Der nicht-kanonische Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg

Von den 19 humanen Wnt-Proteinen sind nur einige in der Lage, den β -Catenin-abhängigen kanonischen Wnt-Signalweg zu aktivieren. Die anderen Wnt-Proteine sind aber nicht etwa inaktiv, sondern sie lösen zelluläre Antworten aus, die verschieden von den β -Catenin-vermittelten Prozessen sind. So verändern sie zum Beispiel die Zellmobilität und reduzieren die Zelladhäsion.[82] Untersuchungen mit chimären Wnt-Proteinen und Frizzled-Rezeptoren zeigten, dass die humanen Frizzled-Rezeptoren 1, 3 und 6[82,83] und die Wnt-Proteine 4, 5A und 11[82,84] bevorzugt diese β -Catenin unabhängigen Antworten auslösen. Die von diesen Proteinen ausgelösten Antworten sind kalziumabhängig, weshalb dieser nicht-kanonische Signalweg auch den Namen Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg trägt. Ein striktes Motiv, welches für diese Funktion verantwortlich ist, konnte weder bei den Rezeptoren noch bei den Wnt-Liganden gefunden werden, jedoch zeigte sich, dass der C-Terminus der Wnt-Proteine wesentlich für die beschriebene Funktion ist.[85] Aufseiten der Rezeptoren ist die Unterscheidung zwischen β -Catenin-abhängigen oder -unabhängigen Signalwegen stark kontextabhängig, wie Überexpressionsstudien zeigten.[86] Diese Studien verdeutlichten auch, dass

nicht LRP5/LRP6, sondern die integralen Membranproteine Knypek und Ror2 als Korezeptoren für diesen nicht-kanonischen Signalweg dienen.[87] Der Korezeptor Ror2 kann zusätzlich noch den kanonischen Wnt-Signalweg inhibieren, was eine Möglichkeit der Regulation beider Signalwege darstellt.[86] Diese Regulation geschieht möglicherweise durch CaMKII-abhängige Aktivierung der TAK1 MAP-Kinase (MAPK), welche wiederum die NLK MAPK aktiviert, was schließlich zur Phosphorylierung und Inaktivierung der TCF/Lef-Transkriptionsfaktoren führt.[88] Durch diese Phosphorylierung wird die Bindung an die DNA verhindert und der β -Catenin-abhängige Signalweg unterdrückt. Eine weitere Möglichkeit der Regulation besteht durch eine CaMKII-unabhängige Verstärkung des β -Catenin Abbaus, vermittelt durch Aktivierung von Siah1/2.[89] Studien mit GPCR Inhibitoren wie dem Pertussis Toxin haben gezeigt, dass der nächste Schritt des Signalwegs vom aktivierten Rezeptor-Korezeptorkomplex über G-Proteine zur Phospholipase C (PLC) führt.[90,91] Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositol-3-Phosphat in Inositol-3-Phosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG).[92] Inositol-3-Phosphat diffundiert zu den Rezeptoren und setzt Kalzium frei. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert die CaMKII Kinase[93] und die Phosphatase Calcineurin[94]. DAG und Kalzium aktivieren gemeinsam die Protein Kinase C (PKC).[91] Da DAG nicht aus der Membran diffundiert, wird die PKC nur an der Plasmamembran aktiviert, wohin sie auch Dishevelled rekrutiert. Das aktive Dsh-Protein bindet Daam1, ein Protein der Formin Familie, welches seinerseits Rho bindet, das durch ein bisher unbekanntes Rho-GEF aktiviert wird.[95] Als Ergebnis dieser Signalkaskade wurden die Phosphatase Calcineurin und die Kinasen CaMKII und PKC aktiviert. Des Weiteren wurde durch den Signalweg die kleine GTPase Rho aktiviert, die für die beobachtete erhöhte Zellmobilität verantwortlich ist, da sie auf das Aktinzytoskelett wirkt (Abb. 5).[82] Der Effekt der Kinasen und Phosphatasen ist zelltypabhängig. So aktiviert Calcineurin zum Beispiel den immunologisch wichtigen Transkriptionsfaktor NF-AT[94], während die Wnt-abhängige PKC-Aktivierung für das Knochenwachstum eine entscheidende Rolle spielt[96].

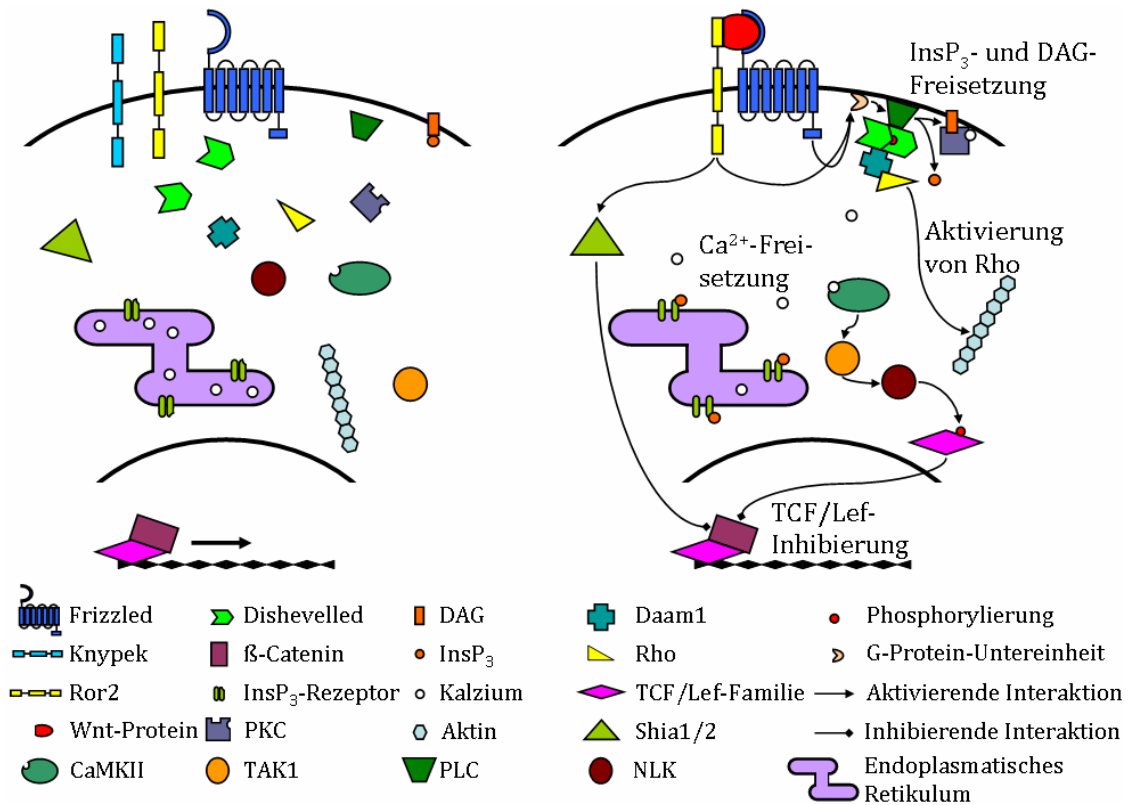


Abbildung 5: Übersicht über den Wnt/Ca²⁺-Signalweg. Dargestellt sind nur einige ausgewählte Interaktionen. Die von Calcineurin ausgehenden Interaktionen sind nicht dargestellt.

1.2.4 Der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg

Für die Entwicklung höherer Lebewesen ist es nicht ausreichend, in jeder Zelle ein bestimmtes Repertoire an Genen abzulesen und in Proteine zu translatieren. Oft werden auch räumliche Signale benötigt, um Strukturen auszurichten, Organe zu entwickeln oder gerichtete Bewegungen von Zellen zu ermöglichen. Für diese Prozesse wird der Wnt/PCP-Signalweg genutzt, wobei PCP für „planare Zellpolarität“ (englisch: planar cell polarity) steht. Dieser Signalweg wird auch als Wnt/CE-Signalweg bezeichnet, wobei CE mit „einheitliche Ausdehnung“ (englisch: convergent extension) übersetzt werden kann und die gleichartige Bewegung von Zellen oder Zellverbänden meint. Diese Bewegungen sind von großer Bedeutung für die Entwicklung des Menschen. Von der Gastrulation bis zum Schließen des Neuralrohrs oder dem Wachstum der Nervenzellen werden diese Signale beispielsweise benötigt.[97,98]

Da diese Prozesse äußerst kompliziert sind und - von wenigen Ausnahmen abgesehen[99,100] - nicht in Zellkulturen, sondern nur in gesamten Organismen

untersucht werden können, beschränken sich die vorhandenen Erkenntnisse auf Abläufe in einfachen Modellorganismen wie *D. melanogaster*. In *D. melanogaster* werden unter anderem die Orientierung der Haare auf den Flügeln sowie die Ausrichtung der Omatidien und der Borsten auf dem Körper durch den Wnt/PCP-Signalweg gesteuert.[101] Für die Ausrichtung dieser zellulären Strukturen muss es eine intrazelluläre Polarität geben, für die in *D. melanogaster* der Frizzled2-Rezeptor verantwortlich ist.[102] Auf der proximalen Seite der Zelle ist der Frizzled-Rezeptor aktiv und rekrutiert das Protein Dishevelled an die Membran. Beim Wnt/Ca²⁺-Signalweg geschieht dies durch die DEP-Domäne von Dsh. Dadurch kommt es zur Polymerisation von Dsh, was zu einer Zusammenlagerung und Aktivierung weiterer Frizzled-Rezeptoren führt.[102] Der auf einer Zelle proximal lokalisierte Frizzled-Rezeptor interagiert mit dem distalen Van-Gogh-Rezeptor (Vang; auch Stabismus (Stbm) genannt) auf der benachbarten Zelle. Das Protein Prickle wird durch aktives Vang/Stbm an die Zellmembran rekrutiert, und beide Proteine können Dsh binden, welches dann auf der distalen Zellseite nicht mehr für die Aktivierung von Frizzled-Rezeptoren zur Verfügung steht.[103,104] Die Bindung von Dsh durch Vang/Stbm und Prickle geschieht durch die basische PDZ-Domäne von Dsh, an die auch das Protein Diego binden kann.[105] Die Bindung von Diego an Dsh erfüllt zwei Aufgaben, die beide die Aktivität des Frizzled-Komplexes verstärken. Zum einen schließt sie eine Bindung von Prickle oder Vang/Stbm aus, und zum anderen aktiviert Diego Dsh, indem es dessen Phosphorylierung fördert.[105] In dem beschriebenen Prozess spielen allerdings noch weitere Proteine eine Rolle. Eines davon, Flamingo (Fmi), ist ein Transmembranprotein mit ungewöhnlicher Struktur. Es besitzt sieben Transmembranregionen, einen einzigartigen C-Terminus und neun extrazelluläre Cadherin-Domänen.[100] Mutantanalysen zeigen, dass es zusammen mit Vang/Stbm den Wnt/PCP-Signalweg reguliert, auch wenn beide Proteine nicht direkt molekular miteinander interagieren, sondern nur zu einer gewissen Entwicklungsphase kolokalisieren.[106] Solch eine Kolokalisation wurde auch für den aktiven Frizzled-Komplex mit Fmi beschrieben.[100] Bisher ist für Fmi allerdings kein molekularer Interaktionspartner gefunden worden[107], und auch die Kolokalisation kann je nach zellulärem Kontext entweder zu einer Aktivierung oder zu einer Inhibierung der Frizzled-Aktivität führen.[108] Beide Sachverhalte erschweren die eindeutige Zuweisung einer Funktion von Fmi im

Wnt/PCP-Signalweg, wobei Mutantanalysen klar zeigen konnten, dass es sich bei Fmi um ein wichtiges Protein des Wnt/PCP-Netzwerkes handelt.[109-111] Als Ergebnis dieses negativen Rückkopplungsmechanismus ist nur an der proximalen Zellseite ein aktiver Komplex aus Frizzled-Rezeptoren mit polymerisiertem Dsh vorhanden, der auf der distalen Seite durch Vang/Stbm und Prickle unterdrückt wird (siehe Abb. 4). Auf diese Weise wird der anfängliche geringe Aktivitätsunterschied des Frizzled-Rezeptorkomplexes an den Zellpolen in ein fast binäres Aktiv-/Inaktiv-Signal übersetzt.

Welche Liganden diesen Signalweg auslösen, ist Gegenstand intensiver Forschungen. Wnt-Proteine kommen nicht infrage, werden sie doch entweder nicht in den entsprechenden Geweben oder nicht zur richtigen Zeit exprimiert.[112] Die aktuelle Hypothese, wie die initiale Orientierung des Frizzled/Vang-Systems erreicht wird, geht von einer Wechselwirkung der zwei nicht-klassischen Cadherine Fat (Ft) und Dachsous (Ds) mit dem Frizzled-Komplex aus.[113] Ob das Fat-System tatsächlich den Frizzled-Komplex entlang der proximalen/distalen Zellachse ausrichtet, ist nicht bewiesen und Gegenstand aktueller Forschung.[111,114] Die beiden Proteine Ft und Ds wirken als Ligand und gleichzeitig als Rezeptor für den jeweils anderen Partner. Auf diese Weise kann die Menge von Ft und Ds auf einer Zelle die Verteilung auf der benachbarten Zelle beeinflussen.[113] Es entsteht ein Zellverband, der die Anzahl an Ft- und Ds-Rezeptoren auf der Nachbarzelle genau messen und diese Information auch von Zelle zu Zelle weitergeben kann. Für eine Orientierung zellulärer Strukturen wird aber zusätzlich ein Gradient benötigt. Dieser Gradient entsteht, indem ein Wnt-Signal die Expression von Ds fördert.[115] Gleichzeitig inhibiert dieses Wnt-Signal die Aktivität von Four-jointed (Fj), eines weiteren regulatorischen Proteins dieses Signalwegs.[115] Fj ist eine am Golgi Apparat assoziierte Kinase, welche die Cadherin-Domänen von Ds und Ft phosphorylieren kann.[116] Die Phosphorylierung von Ft verstärkt seine Fähigkeit, Ds zu binden, während sie bei Ds die Fähigkeit reduziert, Ft zu binden.[117] In Abbildung 6 sind diese möglicherweise getrennt arbeitenden Signalwege zusammengefasst.

Es ist interessant zu erwähnen, dass Ft und Ds über den Hippo-Signalweg (genauer: die Proteine Merlin, Expanded, Hippo, Salvador, Mats, Warts und Yorkie) auch die Zellproliferation und Apoptose regulieren können.[113,118] Dadurch kann in Zukunft möglicherweise der Zusammenhang zwischen

Organgröße, vermittelt durch die Zellproliferation und Apoptoseinduktion, und Organfunktion, vermittelt durch die polarisierten Zellen, hergestellt werden. [113,118]

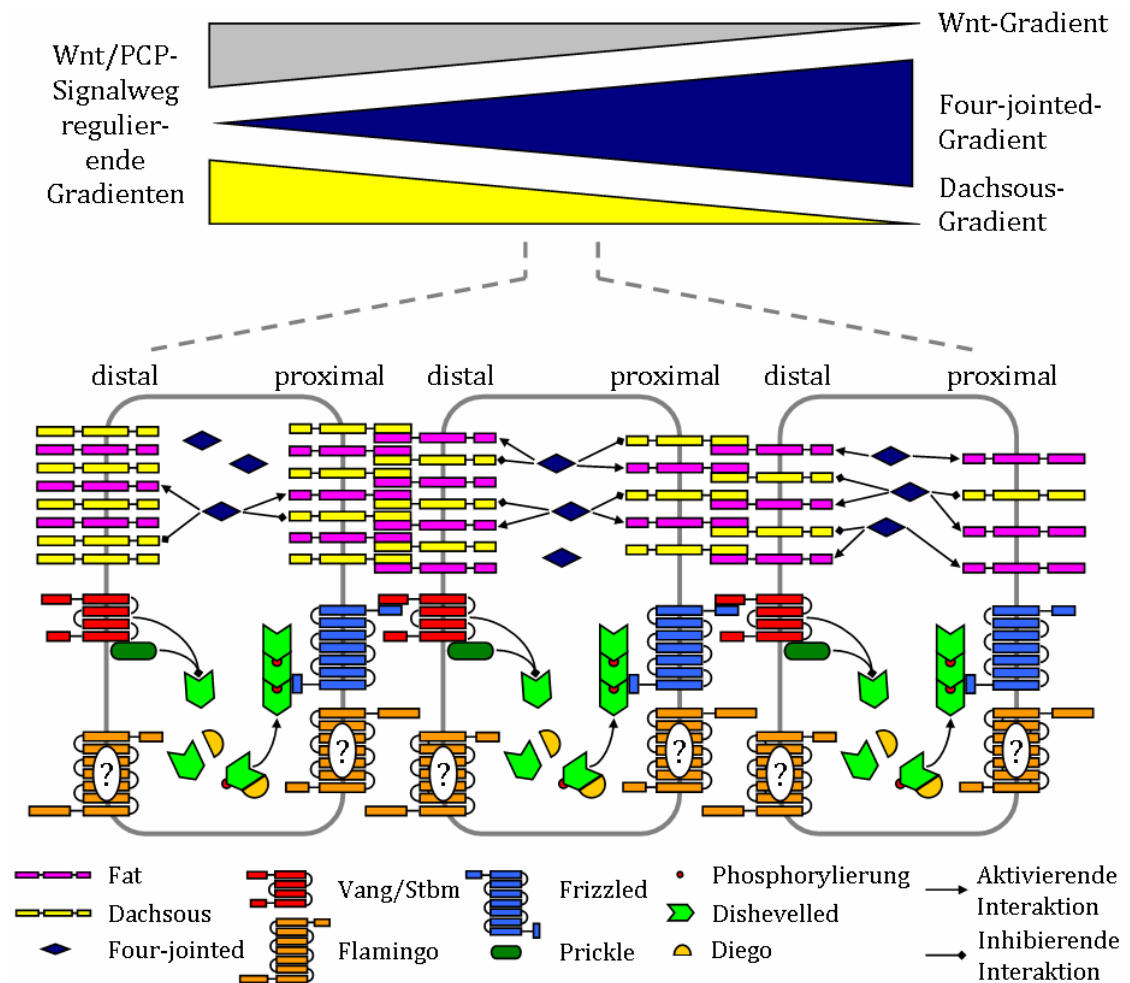


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Wnt/PCP-Signalwegs. Im oberen Teil sind die Gradienten veranschaulicht, die auf die Zellen einwirken. Im unteren Teil sind drei schematische Zellen dargestellt. Es ist keine Verbindung zwischen dem Fat/Dachsous- und dem Frizzled-System eingezeichnet, da diese noch nicht eindeutig bewiesen ist. Das Protein Flamingo ist nicht mit einer Funktion assoziiert, was durch ein Fragezeichen dargestellt ist, da diese noch nicht ausreichend geklärt ist. Die Gradienten im oberen Teil der Abbildung wirken dadurch auf die drei schematisch dargestellten Zellen, so dass die Aktivität von Four-jointed ansteigt und das Expressionslevel von Dachsous abnimmt.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Chemische Biologie nutzt das Methodenspektrum der Biologie und der Chemie, um Sachverhalte aufzuklären, die nur durch das Zusammenspiel beider Wissenschaften effektiv zu lösen sind. Zu Beginn der Arbeit waren in der Abteilung bereits erste Voraussetzungen geschaffen worden, um die interne Substanzbibliothek an zellulären Systemen zu testen. Mit diesen Voraussetzungen sollten Lösungen für verschiedene biologische Fragestellungen entwickelt werden. Dafür sollte zunächst aus der Substanzdatenbank eine Auswahl von Verbindungen erfolgen. Die Auswahlkriterien hatten sich an den Erfordernissen zellulärer Testsysteme zu orientieren. Das Ziel war, die eigentliche Auswahl computergestützt durchzuführen, wobei eine Rücksprache mit erfahrenen Medizinalchemikern der Abteilung stattfinden sollte. Es war geplant, die auf diese Weise erstellte Substanzauswahl in verschiedenen zellulären Tests einzusetzen.

Ein Ziel war die Identifizierung und Untersuchung neuer antibakterieller Substanzen. Diese Tests sollten sich möglichst nahe an klinischen Fragestellungen orientieren und eine standardisierte Methodik nutzen, um eine hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit der aktuellen Antibiotikaforschung zu gewährleisten. Aktive Substanzen sollten in nachfolgenden Untersuchungen näher charakterisiert werden.

Hauptsächlich sollten jedoch eukaryontische Zellkulturen für die zellbiologischen Untersuchungen herangezogen werden. Besonderes Interesse galt dem kanonischen Teil des Wnt-Signalwegs. Die Aufgabe bestand darin, ein Testsystem zu etablieren, welches geeignet war, in höherem Durchsatz die Substanzauswahl und gegebenenfalls andere interessante Substanzbibliotheken untersuchen zu können. Wiederum sollten interessante Verbindungen in weiterführenden Experimenten genauer charakterisiert werden, wobei sowohl die Inhibierung als auch die Aktivierung des Signalwegs von Interesse war. Bei diesen Untersuchungen sollte die Aufklärung des Wirkorts und des Mechanismus der aktiven Substanzen im Vordergrund stehen. Hierzu sollte ein breites Methodenspektrum aus den Gebieten der Biochemie, Zellbiologie und Chemischen Biologie eingesetzt werden. Zudem war eine enge Zusammenarbeit

mit Chemikern der Abteilung vorgesehen. Durch diese Kooperationen sollten - basierend auf vorangegangenen Ergebnissen - neue, aktivere Moleküle und Sonden für chemisch-biologische Untersuchungen entwickelt werden.

3. Material

3.1 Laborgeräte

Labornamen	Firmenname	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäß- Inkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Agarose-Gelkammer	Sub Cell GT	BioRad, Hercules, USA
Autoklav	Varioklav® 400	Thermo Scientific, Waltham, USA
CO ₂ -Inkubatoren	NUAIRE IR Autoflow und NUAIRE DHD Autoflow	Integra Biosciences, Fernwald, D
Eismaschine	AF 80	Scotsman, Vernon Hills, USA
FACS-Gerät	BD LSR II; Software: BD FACS Diva V5.0.3.	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Fluoreszenz- spektrometer	Luminescence Spectrometer 50B	Perkin Elmer, Waltham, USA
Geldokumentation	GelLogic200 Imaging System; Software: Kodak Molecular Imaging Software V4.0.5	Raytest, Straubenhardt, D
Inkubator	INE 400	Binder, Tuttlingen, D
LI-COR-Scanner	Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D
Magnetrührer	IKAMAG RH	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, D
Mikroskope	Labovert; Axiophot; Axiovert 200m und Leica DM IBRE	Ernst Leitz, Wetzlar, D; Zeiss, Oberkochen, D und Leica, Wetzlar, D
Netzgeräte	Power Pack Pac1000; Power Pack Basic und Power Pack HV	BioRad, Hercules, USA

3. Material

PCR-Maschine	Mastercycler <i>epgradient</i> S	Eppendorf, Hamburg, D
pH-Meter	CG 840	Schott, Mainz, D
Pipetten und Mehrkanalpipetten	verschiedene Versionen	Gilson; Limburg-Offheim, D; und Eppendorf, Hamburg, D
Plattenphotometer	Infinite200M und ELISA- Photometer MR 5000	Tecan, Crailsheim, D und Dynatech, Denkendorf, D
Protein-Gelelektro- phoresesystem	MiniProtean 3 Gele	BioRad, Hercules, USA
Reinstwassersystem	Milli-Q Advantage A-10	Millipore, Billerica, USA
Schüttelinkubator	Minitron	Infors HT, Bottmingen, CH
Sequenziergerät	ABI 3130xl Genetic Analyzer; Software: Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Sterilbänke	HERA Safe HS 12 und NUAIRE NUS437-500E	NuncNalge, Rochester, USA; und Integra Biosciences, Fernwald, D
Schüttler	Stuart mini gyro-rocker SSM3 und Swip KL2	Bibby Scientific Limited, Stone, GB und Edmund Bühler, Hechingen, D
Transferkammer für Western Blot	Trans-Blot SD	BioRad, Hercules, USA
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H	Bandelin, Möhrfelden- Wall, D
Ultraschallspitze	Sonoplus HD 2070	Bandelin, Berlin, D
UV/VIS-Spektrometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex-Apparat	Vortex Genie2	Carl Roth, Karlsruhe, D
Waagen	CP3202 S und MC 210 P	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	WB 7	Memmert, Schwabach, D
Zentrifugen	Minispin; Centrifuge 5415R und 5810R	Eppendorf, Hamburg, D

3.2 Verbrauchsmaterialien

Es wurden in der Zellkultur Verbrauchsmaterialien der Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, D), Sarstedt (Nümbrecht, D), Nalgene (Rochester, USA), Carl Roth (Karlsruhe, D), Menzel (Braunschweig, D) und Corning (New York, USA) verwendet. Weitere Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg, D), Gilson (Limburg-Offenheim, D) und Pierce (Rockford, USA) bezogen.

Außergewöhnliche Verbrauchsmaterialien sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen vermerkt.

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders in den jeweiligen Methodenbeschreibungen vermerkt, wurden Chemikalien der Firmen Sigma Aldrich (Steinheim, D), Serva (Heidelberg, D), Riedel-de-Haën (Seelze, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt, D) und Promega (Mannheim, D) verwendet.

Für die Zellkultur wurden folgende Medien und Zusätze verwendet.

Produktname	Hersteller
DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin	PAA, Pasching, A
Geneticindisulfat (G418)-Lösung 50 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, D
McCoy's 5A-Medium ohne L-Glutamin	PAA, Pasching, A und GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D
MEM nicht-essenzielle Aminosäuren 100x	Sigma Alrich, Steinheim, D
L-Glutamin-Lösung (2 M)	Sigma Alrich, Steinheim, D
Penicillin (10.000 U/ml)-Streptomycin (10 mg/ml) Lösung in 0,9% NaCl	Sigma Alrich, Steinheim, D
RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin	PAA, Pasching, A
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	Sigma Alrich, Steinheim, D
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Pasching, A; und GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D

3.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
5x SDS-PAGE-Ladepuffer	0,3125 M Tris-HCl (pH=6,8) 10% SDS 50% Glycerin 25% β -Mercaptoethanol 0,3 g Bromphenolblau
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	250 mM Tris-HCl (pH=8,3) 1,92 M Glycin 0,1% SDS
4x Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)
4x Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)
Bradford-Reagenz	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml Ethanol (95%) lösen 100 ml Phosphorsäure (85%) zufügen und auf 1 l mit H ₂ O auffüllen und filtrieren
Coelestin Blau-Färbelösung	100 ml 5% Eisenammoniumalaun in Wasser 0,5 g Coelestin Blau 3 Min auf 95 °C erhitzen, abkühlen und filtrieren 14 ml Glycin zugeben
Coomassie-Färbelösung	0,1% Coomassie Brilliant Blau 50% Methanol 10% Essigsäure
DNA-Probenpuffer	10 mM Tris-HCl (pH=7,2) 30% Glycin 25 mM EDTA 1 Spatelspitze Orange G
Entfärberlösung	5% Methanol 10% Essigsäure
Fixierpuffer	100 mM K-Pipes (pH=6,8) 10 mM EGTA

3. Material

	1 mM MgCl ₂
	0,1% Tween20
	3,7% Formaldehyd
K-HEPES-Puffer	50 mM HEPES (pH=8,0) den pH-Wert durch Zugabe von KOH einstellen
Kern-Extraktionspuffer	50 mM β -Glycerolphosphat (pH=7,3) 420 mM NaCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA 1 mM DTT 25% Glycerol
Kolloidale Coomassie- Färbelösung	Lösung A: 2% (v/v) H ₂ PO ₄ 10% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ Lösung B: 5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 Fertige Färbelösung: 1 Teil Lösung B 40 Teile Lösung A 10 Teile Methanol
Luziferase-Lysis-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH=7,5) 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1% NP-40 1 mM DTT 5% Glycerol
Luziferase-Reagenz	0,5 mM CoenzymA Tris zum Einstellen des pH (pH=7,8) 0,5 mM EDTA 0,5 mM ATP

3. Material

	10 mM MgCl ₂
	40 mM Tricin
	0,5 mM Luciferin
	10 mM DTT
PBS	50 mM Na ₂ HPO ₄ (pH=7,4)
	150 mM NaCl
Pulldown-Lysispuffer:	50mM PIPES (pH=7,4)
	50mM NaCl
	5mM MgCl ₂
	5mM EGTA
	0,1% NP40
	0,1% Triton X-100
	0,1% Tween20
Ripa-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH=7,4)
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0,25% Natrium-Desoxycholat
	1% NP-40
	1 mM PMSF
	1 µg/ml Aprotinin
	1 µg/ml Leupeptin
	1 µg/ml Pepstatin
	1 mM Na ₃ VO ₄
	1 mM NaF
Stripping-Puffer	7 M Guaninium Hydrochlorid (pH=10,8)
	50 mM Glyzin
	0,05 mM EDTA
	0,1 mM KCl
	20 mM Mercaptoethanol (frisch zugeben)
TAE	40 mM Tris (pH=8,5)
	1 mM EDTA
	20 mM Essigsäure
TBS	10 mM Tris-HCl (pH=7,4)

3. Material

	150 mM NaCl
TBS-T	10 mM Tris-HCl (pH=7,4)
	150 mM NaCl
	1% Tween20
TE	10 mM Tris-HCl (pH=7,4)
	50 mM EDTA
TES	10 mM Tris-HCl (pH=8,0)
	10 mM EDTA
	2% (w/v) SDS
TFB1	30 mM Kaliumacetat (pH=5,0)
	100 mM RbCl
	50 mM MnCl ₂
	10 mM CaCl ₂
	15% (v/v) Glycerol
TFB2	10 mM MOPS (pH=8,0)
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl ₂
	15% (v/v) Glycerol
Transferpuffer	48 mM Tris-HCl (pH=9,2)
	39 mM Glycin
	1,3 mM SDS
	20% Methanol
Zell-Waschpuffer	50 mM β -Glycerolphosphat (pH=7,3)
	1,5 mM EGTA
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	0,1 mM Na ₃ VO ₄
	50 μ g/ml PMSF
	10 μ g/ml Aprotinin
	10 μ g/ml Leupeptin
Zytoplasma-Extraktionspuffer	40 mM HEPES (pH=7,3)
	0,1% NP-40
	5 mM EDTA

5 mM MgCl₂
1 mM DTT
1 mM Benzamidine
1 mM Na₃VO₄
50 µg/ml PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

3.5 Nährmedien

3.5.1 Nährmedien für die Zellkultur

Zelllinien	Zusammensetzung
HEK293; HeLa; BSC-1; MCF7; L-Zellen, C57MG	10% FCS 1x nicht-essenzielle Aminosäuren 1x Natriumpyruvat 50 U/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin-Streptomycin-Lösung in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und Glutamin (5% CO ₂)
Wnt-Reportergen-Zelllinie; Wnt3a-Zellen	10% FCS 1x nicht-essenzielle Aminosäuren 1x Natriumpyruvat 50 U/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin-Streptomycin-Lösung 250 µg/ml G418 in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und Glutamin (5% CO ₂)
HepG2, SW480	10% FCS 50 U/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin-Streptomycin-Lösung in RMPI 1640 (5% CO ₂)
HCT116	10% FCS 2 mM Glutamin

in Mc'Coys 5A-Medium (5% CO₂)

3.5.2 Nährmedien für die Bakterienkultur

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Bacto-Trypton-Extrakt auf 1 l mit H ₂ O auffüllen (pH=7,4), nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin (für Agar-Platten 10 g Bacto-Agar und 50 µg/ml Ampicillin)
Müller Hinton-Boullion	2 g Rindfleischinfusion 17,5 g Caseinhydrolysat 1,5 g Stärke auf 1 l mit H ₂ O auffüllen (pH=7,4) (Die Boullion wurde als Pulver von der Firma Carl Roth, Karlsruhe, D bezogen; Bestellnr.:X927.1)

3.6 Biologisches Material

3.6.1 Eukaryontische Zelllinien

Name	Bestellnummer	Ursprung
HEK293	ATCC CRL-1573 und DSMZ ACC 305	humane embryonale Niere
SW480	DSMZ ACC 313	erzeugt aus einem humanen Dickdarmkrebs (Grad 4)
HCT116	ATCC CCL-247 und DSMZ ACC 581	erzeugt aus einem humanen Dickdarmkrebs
Reportergergen Zelllinie	erhalten von Park <i>et.</i> <i>al.</i> [119]	basierend auf HEK293
HepG2	ATCC HB-8065	erzeugt aus einem humanen

		Leberkarzinom
HeLa	ATCC CCL-2 und DSMZ ACC57	humane Epithelzellen (Gebärmutterschleimhaut)
BSC-1	ATCC CCL-26	epitheliale Nierenzellen aus <i>Cercopithecus aethiops</i> (Grüne Meerkatze)
MCF7	ATCC HTB-22	erzeugt aus einem humanen Brustkrebs
C57MG	erhalten von J. Kitajewski, Department of Pathology, Columbia University, New York	Brustdrüsenepithel der Maus
Wnt3a-Zellen	ATCC CRL-2647	L-M(TK)-Zellen (ATCC CCL-1.3), die Wnt3a produzieren
L-Zellen	ATCC CRL-2648	L-M(TK)-Zellen (ATCC CCL-1.3), die als Kontrolle mit Leervektor transfiziert wurden

3.6.2 Bakterienstämme

3.6.2.1 Für Klonierungen genutzte Stämme

Escherichia coli TG1

Genotyp: K12 (lac-pro), thi-1, supE, hsdD5, [F'traD36, proAB⁺, lacI^Q, lacZΔM15]

3.6.2.2 Für antibiotische Untersuchungen genutzte Stämme

Bakterienstamm	Nummer in der Stammsammlung
Escherichia coli	DSMZ 1103
Staphylococcus aureus (MRSA)	ATCC 29213 und DSMZ 2569
Staphylococcus aureus (MRSA)	ATCC und 25923 DSM 1104
Pseudomonas aeruginosa	DSMZ 1117
Acinetobacter baumannii	DSMZ 30008

3.7 Enzyme und Kit-Systeme

Produktname	Hersteller
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Qiagen Plasmin Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Überlingen, D; Bestellnr. 4337457
ATP Determination Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.8 Protein- und DNA-Standards

3.8.1 Proteinstandards

Produktname	Hersteller
Precision Plus Protein Dual Color	BioRad, Hercules, USA
Precision Plus Protein Kaleidoscope	BioRad, Hercules, USA

3.8.2 DNA-Standards

Produktname	Hersteller
Gene Ruler 1 kB	Fermentas, St. Leon-Rot, D

3.9 Oligonukleotide

CysGFP_rev

5' TTGAATTCTCAGCACTTGTACAGCTCGTCC

TevGFP_forw

5' AAGAGCTCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGTGAGCAAGGGCGAGG

NusTag Primer (Novagen Standard Primer, forward)

5' AAAAGCCGGAGCACTGATTATG

3.10 Antikörper

3.10.1 Erstantikörper

Antigen	Art des Antikörpers	Ursprungsorganismus	Hersteller	Verdünnung
humanes β -Catenin	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz sc-7199	WB 1:1000
humanes β -Catenin	monoklonal	Maus	BD Transduction Laboratories 610153	WB 1:5000 IF 1:500
humanes Vinculin	monoklonal	Maus	Chemicon International MAB1674	IF 1:250
humanes Vinculin	monoklonal	Maus	Santa Cruz sc-59803	IF 1:250
humane Cdc2	monoklonal	Maus	Santa Cruz sc-54	WB 1:1000
Maus-Cytokeratin-Endo-A	monoklonal	Ratte	Developmental studies hybridoma bank TROMA-I	IF 1:25
humanes 20S-Proteasome-Core-Subunits	polyklonal	Kaninchen	Calbiochem ST1053	IF 1:500
Pes1	polyklonal	Maus	Abnova H00023481-B02	WB 1:100
humanes Vang1	polyklonal	Maus	Abcam ab69227	WB 1:100
α -Tubulin		Kaninchen	Santa Cruz sc-	WB 1:3000

7979-R

3.10.2 Markierte Zweitantikörper und Naturstoffe

Antigen/Naturstoff	Ursprungs- organismus	Markierung	Hersteller	Verdünnung
Thiostrepton		FITC	synthetisiert durch S. Schoof	IF 10 μ M
Maus	Ziege	HRPO	Thermo Scientific	WB 1:15.000
Streptavidin		Cy3	Invitrogen 43-8315	IF 6 μ g/ml
Kaninchen	Ziege	HRPO	Thermo Scientific 31460	WB 1:15.000
α -Tubulin		FITC	Sigma Aldrich F2168	IF 1:500
Phalloidin		TRITC	Sigma Aldrich P1951	IF 1:1000 (Lsg. 1mg/ml)
DAPI			Sigma Aldrich 32670	IF 1:1000 (Lsg. 1mg/ml)
Propidium Iodid			Sigma Aldrich 81845	50 μ g/ml
Kaninchen	Ziege	Alexa 555	Invitrogen A21429	IF 1:500 (Proteasom- Färbung)
MitoTracker Red CMXRos			Invitrogen M7512	IF 150nM (für 30 min vor der Färbung)

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien

Bei der DNA-Isolierung muss zwischen der Aufreinigung von Plasmiden und der von genomischer DNA unterschieden werden. Die Reinigung von Plasmiden erfolgte mit Kitsystemen von Qiagen. Falls kleine Mengen Plasmid-DNA benötigt wurden, wurde das „Mini Plasmid Isolation Kit“ benutzt; für große Mengen das „Maxi Plasmid Isolation Kit“. Beide Kitsysteme wurden genau nach Angaben des Herstellers benutzt.

Genomische DNA wurde nach einem Protokoll von C. K. C. Syn und S. Swarup isoliert.[120] Dafür wurden 50 ml einer Bakterienkultur mit einer optischen Dichte bei 600 nm von 1,2 bis 1,6 genutzt. Die Bakterien wurden pelletiert und zwei mal mit 20 ml einer 1% Kochsalzlösungen gewaschen um extrazelluläre polymere Stoffe (EPS) zu entfernen. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml TES-Puffer resuspendiert und für 15 min bei 75 °C erhitzt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und zweimal mit einer Phenol-Chloroform-Mischung extrahiert. Dazu wurden 15 ml einer Lösung aus drei Volumenteilen Phenol und einem Volumenteil Chloroform hinzu gegeben und die Lösung wurde gründlich invertiert. Es bilden sich zwei Phasen aus, wobei die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben und die Proteine sich in der Interphase anordnen. Die wässrige Phase wird noch einmal mit Phenol-Chloroform extrahiert; durch das Wiederholen dieser Extraktion lassen sich die Nukleinsäuren effizient von den bakteriellen Proteinen abtrennen. Die wässrige Phase wurde mit 15 ml Chloroform versetzt invertiert und 5 min bei 15.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die organische Phase wurde verworfen. Auf diese Weise wurde die wässrige Phase von Phenolresten gereinigt und anschließend mit 1,5 ml 3 M Natriumacetat und 15 ml Isopropanol versetzt. Durch Inversion und Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 g für 15 min wurden die Nukleinsäuren gefällt. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 4 °C und 15.000 g für 15 min zentrifugiert. Durch erneute Zugabe von 70% Ethanol

wurde das Pellet vom Boden des Reaktionsgefäßes gelöst, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 15.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet wurde in TE-Puffer mit 2 µg/ml RNase (Fermentas, St. Leon-Rot, D) resuspendiert.

4.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration einer DNA-Lösung wurde eine geeignete Verdünnung in TE-Puffer hergestellt. Diese Verdünnung wurde in einem Eppendorf-BioPhotometer vermessen, wobei reiner TE-Puffer als Referenz genutzt wurde. Die erhaltenen Konzentrationswerte wurden anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

4.1.3 Erzeugung bakterieller Kryokulturen

Es wurden für jeden bakteriellen Stamm oder Klon zwei verschiedene Arten der Kryokonservierung angewendet. Dazu wurden einer Übernachtskultur 500 µl entnommen und in zwei Kryogefäße pipettiert. Zu dem einen Gefäß wurden 500 µl einer sterilen 7% DMSO-Lösung und zu dem anderen 500 µl einer sterilen 80% Glycerollösung gegeben. Beide Gefäße wurden invertiert und bei -80 °C eingefroren und gelagert. Durch die Arbeit mit sehr verschiedenen Bakterienstämmen wurden verschiedene Anforderungen an das Kryomedium gestellt. Die Möglichkeit, immer zwei Methoden parallel zu nutzen, erhöhte die Wahrscheinlichkeit, eine stabile Kryokultur zu erzeugen.

4.1.4 Polymerasekettenreaktion

Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden in einem Thermocycler der Firma Eppendorf durchgeführt. Bei einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 200 µM Desoxynukleotide, je 5 µM der genspezifischen Primer, 5 µl 10-fach-Puffer, 150 ng DNA und 1,25 U Pfu-Polymerase eingesetzt. Im Falle einer Kolonie-PCR wurden nicht 150 ng DNA verwendet, sondern es wurde eine Bakterienkolonie in 5 µl destilliertem Wasser resuspendiert und anschließend für 10 min bei 95 °C inkubiert; alle anderen Reagenzien wurden in den beschriebenen

Konzentrationen eingesetzt. Ein typisches PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

1. Denaturierung bei 95 °C für 3 min
2. Denaturierung bei 95 °C für 1 min
3. Anlagern der Primer bei einer geeigneten Temperatur (Standard 58 °C) für 30 s
4. DNA-Synthese bei 72 °C für 1,5 min pro 1 kb
5. Finaler Synthesezyklus bei 72 °C für 2 min

Die Schritte zwei bis vier wurden wiederholt, um genügend PCR-Produkt zu synthetisieren. Im Falle einer analytischen PCR wurden 35 Zyklen durchgeführt im Gegensatz zu 25 Zyklen bei anschließender Restriktionsspaltung. Der Reaktionspuffer und die Polymerasen wurden von Fermentas bezogen. Polymerasekettenreaktionen wurden mit dem Qiagen PCR Purification Kit gereinigt.

4.1.5 DNA-Gelelektrophorese

Da DNA-Fragmente nach dem Logarithmus ihres Molekulargewichts getrennt werden, wurden je nach Größe Agarose-Gele mit 0,6% bis 2% (w/v) Agarose genutzt. Als Puffersystem wurde TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, bei 8 bis 14 V/cm aufgetrennt und nach einer zehnmütigen Färbung in einem Färbepad mit 250 µM Ethidiumbromid mittels eines Transilluminators und entsprechender Software dokumentiert.

4.1.6 Restriktionsspaltung

Restriktionsspaltungen wurden mit Enzymen und Puffern der Firma New England Biolabs durchgeführt. Restriktionsspaltungen wurden in 20 µl Gesamtvolumen mit 2 µl DNA, was mindestens 200 ng entsprach, und 5 U Enzym in dem entsprechenden Puffersystem mit gegebenenfalls 200 µg/ml BSA durchgeführt. Für Restriktionsspaltungen mit mehreren Enzymen wurden von jedem Enzym 5 U eingesetzt und das für alle bestmögliche Puffersystem gewählt. Restriktionsspaltungen wurden immer zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Qiagen PCR Purification Kit gereinigt. Falls die Fragmente

auf diese Art nicht zu trennen waren, wurden sie in einem Gel aufgetrennt aufgereinigt und durch das Qiagen Gel Extration Kit aufgereinigt.

4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen wurden 100 ng des Vektors eingesetzt. Es wurden immer drei parallele Ansätze durchgeführt. Der erste Ansatz beinhaltete nur das zu ligierende Plasmid und diente als Kontrolle der Effizienz der vorangegangenen Restriktionsspaltung. Die anderen beiden Ansätze enthielten einen dreifachen und einen sechsfachen Überschuss des DNA-Fragments, welches eingesetzt werden sollte. Bei den Ligationen diente die Stoffmenge als Grundlage der Berechnungen. Das Gesamtvolumen der Ligationen betrug 20 µl; die eingesetzten Enzyme wurden von der Firma Fermentas bezogen.

4.1.8 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen waren chemisch kompetent. Die Methode ist entnommen aus Sambrook *et al.*[121] Über Nacht wurde eine Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes bei 37 °C und 150 rpm angezogen. Diese Kultur diente als Ausgangsmaterial für eine 100 ml Kultur, die bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,3 bis 0,5 wuchs. Die Bakterien wurden bei 4.000 g und 4 °C in 5 min sedimentiert und das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem (4 °C) TFB1-Puffer resuspendiert und für 90 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden nun bei 4.000 g und 4 °C in 5 min sedimentiert und das Pellet wurde diesmal in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots von 300 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und waren bei -80 °C mehrere Monate haltbar. Es war für die Transformationseffizienz von besonderer Bedeutung die Zellen während des gesamten Vorgangs immer bei 4 °C zu halten.

4.1.9 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für jeden erzeugten Vektor wurde ein Aliquot der chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen aufgetaut. Pro Transformation wurden 100 µl der Zellen benötigt, deshalb konnten immer drei parallele Experimente durchgeführt werden. Eines der

Experimente enthielt die Ligation mit dem dreimolaren Überschuss an Insert, eines den sechsmolaren Überschuss und das dritte Experiment enthielt nur den ligierten leeren Vektor als Kontrolle. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und zu je 100 µl in bereitgestellte kalte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es wurde 1 µl des Ligationsansatzes zugegeben und die Zellen wurden für genau 60 s bei 42 °C inkubiert. Anschließend kamen sie für 120 s auf Eis und wurden danach in 900 µl 37 °C warmen LB-Medium aufgenommen und 1h bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Auf eine bereitgestellte Platte aus LB-Agar mit den entsprechenden Antibiotika wurden 100 µl der Bakteriensuspensionen ausplattiert. Die verbliebenen 900 µl wurden zentrifugiert, in einem geringeren Volumen aufgenommen und ebenfalls ausplattiert. Die Bakterien wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C mit dem Boden nach oben inkubiert. Die Auswertung erfolgte direkt im Anschluss an die Inkubation.

4.1.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierungen wurden in einer zentralen Einrichtung am Max-Planck-Institut durchgeführt. Dazu wurden die Sequenzierungs-PCRs und die Fällungen selbstständig durchgeführt. Die Analyse und das Erstellen des Chromatogramms wurden in der zentralen Einrichtung übernommen. Für die PCR wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 3,2 pmol Primer, 200 ng DNA und 8 µl „BigDye Terminator Mix“ vorgelegt. Das PCR-Programm für Sequenzierungen beinhaltete die folgenden Schritte:

1. Denaturierung bei 95 °C für 3 min
2. Denaturierung bei 95 °C für 1 min
3. Anlagern der Primer bei 58 °C für 30 s
4. DNA-Synthese bei 72 °C für 1,5 min pro 1 kb
5. Finaler Syntheszyklus bei 72 °C für 2 min

Die Schritte zwei bis vier wurden 30-mal wiederholt, um genügend PCR-Produkt zu synthetisieren.

Im Anschluss an die PCR wurde die neusynthetisierte DNA gefällt. Durch die Fällung wurden freie fluoreszenzmarkierte Nukleotide, die die Analyse der PCR stören würden, entfernt. Die PCR-Lösung wurde dazu in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2 µl einer 125 mM EDTA-Lösung, 2 µl einer 3 M

Natriumacetatlösung und 50 µl Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min wurde die Lösung für 10 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, das Pellet getrocknet und zur Sequenzierung gegeben.

4.1.11 Bestimmung des intrazellulären pH-Werts von Bakterienzellen

Die Messung beruht auf den Fluoreszenzeigenschaften des Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succimidylesters (cFDASE) und wurde aus P. Breeuwer et al. adaptiert.[122] Dieser Farbstoff diffundiert ungehindert in Zellen und dient dort als Substrat intrazellulärer Esterasen, wodurch zwei Essigsäureester am Farbstoff abgespalten werden. Bei physiologischem pH-Wert ist er dadurch negativ geladen und die Diffusion aus der Zelle ist deutlich reduziert. Die Succimidylestergruppe des Fluoresceins kann gleichzeitig das gebundene Fluorescein durch Umesterung an ein freies Amin übertragen. Auf diese Art werden intrazelluläre Proteine stabil mit Fluorescein markiert. Durch die Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften einer pH-Wert-sensitiven Wellenlänge relativ zu einer nicht veränderlichen ließ sich nach einer Eichung der intrazelluläre pH-Wert einer Bakterienzelle bestimmen.

Dazu wurde eine Übernachtskultur angelegt, zentrifugiert und in dem 5-fachen Volumen an frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden noch einmal für rund drei Stunden bei 37 °C und 150 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,6 inkubiert. Für jeden Messpunkt wurden 2 ml der Suspension bei Raumtemperatur und 4.000 g für 3 min zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Die Zugabe des gleichen Volumens K-HEPES-Puffer wie der Überstand diente dem Waschen der Bakterien. Die Bakterien wurden bei Raumtemperatur und 4.000 g für 3 min zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde in einem halben Volumen K-HEPES-Puffer, dem 1 µM cFDASE zugesetzt war, resuspendiert und für 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das Pellet mit 50 mM K-Phosphat-Puffer (pH=7,0) gewaschen und nach Zugabe von Glukose in einer Endkonzentration von 10 mM für 30 min bei 30 °C inkubiert. Zweimaliges Waschen mit 50 mM K-Phosphat-Puffer (pH=7,0) entfernte nicht an Proteine gebundenes Fluorescein, das durch die Zugabe der Glukose aktiv sekretiert wurde. Die Zellen waren nun stabil mit

Fluoreszein markiert. Gemessen wurde die Veränderung der Fluoreszenz der pH-sensitiven Wellenlänge von 490 nm im Verhältnis zur nicht sensitiven Wellenlänge von 440 nm. Die Erstellung der Eichgerade erfolgte durch Lyse der Bakterienzellen in 50 mM K-Phosphat-Puffer verschiedener pH-Werte (Abb. 7).

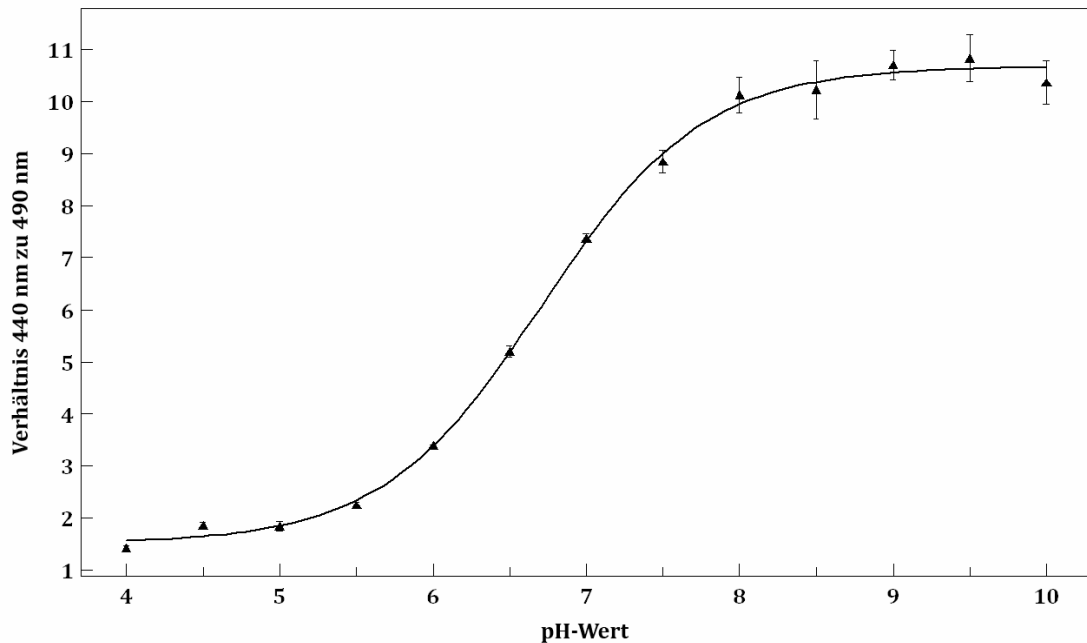


Abbildung 7: Verhältnis der Wellenlängen in Abhängigkeit des pH-Werts. Dargestellt ist das Intensitätsverhältnis der Emission bei 440 nm im Verhältnis zu 490 nm.

4.1.12 Antibakterielle Assays

Die antibakterielle Aktivität wurde mithilfe der Mikrodilutionsmethode nach der DIN 58940 bestimmt. Ein Müller/Hinton-Medium mit 2% Natriumchlorid wurde hierzu mit fünf unabhängigen Kolonien der zu testenden Bakterien beimpft. Die Bakterien wurden nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf 1×10^6 bis 5×10^6 koloniebildende Einheiten pro ml verdünnt und für die Testung verwendet (DIN 58940-81). Welche optische Dichte dieser Bakterienkonzentration entsprach, musste für jeden Bakterienstamm individuell bestimmt werden. Die Testung wurde in 96-Loch-Platten mit zwei Antibiotika (Tetracyclin 1 mg/l; Ampicillin 0,26 mg/l) als Kontrollen durchgeführt. Die Inhibitorkonzentrationen wurden so gewählt, dass die geringste getestete Konzentration wenigstens zwei Verdünnungsstufen über der minimalen inhibitorischen Konzentration lag. Die Bakterien wurden 24 Stunden mit System-Duetz-Abdeckungen (System Duetz, Niederlande) bei 37 °C mit 180

Umdrehungen pro Minute in einem linearen Schüttler kultiviert. Das Wachstum der Bakterien wurde anschließend über die optische Streuung bei 543 nm, 575 nm oder 600 nm bestimmt. Als Kontrolle diente das Wachstum der Bakterien ohne Inhibitoren.

4.1.13 Bestimmung der Zellwandintegrität einer Bakterienzelle

Diese Methode wurde verwendet, um die Zellwandintegrität einer Bakterienzelle zu bestimmen. Dazu wurde der nicht-membrangängige Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid verwendet, der nur bei Lyse der Zelle mit der DNA in Wechselwirkung treten konnte. Durch Anregung bei 535 nm und Messung bei 617 nm wurde dies fotometrisch erfasst.

Dazu wurde aus einer Vorkultur eine neue Kultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,8 bei 600 nm wachsen gelassen. Diese Kultur wurde bei 4.000 g und 3 min zentrifugiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Bakterien wurden in einem Viertel des ursprünglichen Volumens mit PBS resuspendiert und in der Messung eingesetzt. Durch Zugabe von Propidiumiodid in einer Endkonzentration von 40 mg/l wurde die Messung gestartet; nach Erreichen einer gleichmäßigen Kinetik wurde die Substanz zugegeben.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% passagiert. Dazu wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend 1,5 ml Trysin/EDTA-Lösung für 3 bis 5 min bei 37 °C zugegeben. Die Zellen wurden gegebenenfalls durch mechanische Stöße weiter vereinzelt und in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Es wurden 10% der Gesamtzellen, das entsprach 50.000 bis 1.000.000 Zellen, in eine neue 75 cm² Kulturflasche mit 10 ml neuem Medium überführt.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe, D) gezählt. Dafür wurde das Deckglas fest auf die Zählkammer gedrückt, Newtonsche Ringe zeigten den richtigen Sitz des Deckgläschens an, und die Zellsuspension wurde in den entstandenen Hohlraum gegeben. Unter dem Mikroskop konnten die Zellen in den 16 Kleinquadraten der vier Großquadrate gezählt und anschließend durch vier gemittelt werden. Die erhaltene Zahl mit 10.000 multipliziert entsprach den Zellen pro Milliliter.

4.2.3 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden in ihrem idealen Wachstumsmedium ohne Antibiotikum, aber zusätzlich mit 10% FCS und 10% DMSO eingefroren. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 1,5 ml Trysin/EDTA-Lösung für 3 bis 5 min bei 37 °C abgelöst und in 10 ml neuem Medium resuspendiert. Mit einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen gezählt und anschließend bei Raumtemperatur für 3 min bei 2.000 g pelletiert. Die Menge des Kryomediums wurde so gewählt, dass die Zellzahl zwischen 2×10^6 und 4×10^6 Zellen pro ml lag. 500 µl dieser Suspension wurden in ein Kryoröhrchen gegeben und durch einen „Cryo 1 °C Freezing Container“ (Nalgene) bei -80 °C eingefroren. Dieser Container garantiert einen gleichmäßigen Temperaturabfall von 1 °C pro Minute und ist dadurch besonders schonend für die Zellen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für eine dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

4.2.4 Auftauen eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden aufgetaut, indem sie in einem 37 °C Wasserbad erwärmt und in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 10 ml vorgewärmten Medium überführt wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert, um das DMSO des Kryomediums restlos zu entfernen.

4.2.5 Bestimmung der Zytotoxizität einer chemischen Verbindung.

Die Zytotoxizität einer Substanz wurde durch den WST-Assay bestimmt. Der für diesen Test benötigte Formazanfarbstoff wurde als gebrauchsfertige Lösung von der Firma Roche bezogen. Der Test wurde, wie in Tabelle 1 gezeigt, für verschiedene Zwecke mit unterschiedlichen Zellzahlen zu Beginn der Untersuchung durchgeführt. Falls die Inkubationsdauer nicht gesondert angegeben wurde, wurde die Toxizität der Substanz nach 24 Stunden bestimmt.

Tabelle 1: Bedingungen für die Messung von Zytotoxizitätswerten bei unterschiedlichen Fragestellungen. Variationen fanden ausschließlich in der Anzahl der eingesetzten Zellen und bei der Inkubationsdauer statt.

Zelllinie	Zweck des Tests	Dauer der Inkubation	Anzahl der eingesetzten Zellen pro Vertiefung
Verschiedene	allg. Untersuchung zur Toxizität verschiedener Substanzen in verschiedenen Zelllinien	24 Stunden	20.000
Verschiedene	allg. Untersuchung zur Toxizität verschiedener Substanzen in verschiedenen Zelllinien	48 Stunden	10.000
Verschiedene	allg. Untersuchung zur Toxizität verschiedener Substanzen in verschiedenen Zelllinien	72 Stunden	4.000
HEK293	Kontrolle der Wnt3a-abhängigen Luziferase-Messungen	12 Stunden	20.000
MCF7 und HT29	Untersuchung von Thiostrepton-Analoga	72 Stunden	4.000
MCF7 und HT29	Untersuchung von Jasplakinolid- und Chondramid-Analoga	72 Stunden	4.000

Für den Test wurden 100 µl einer Zellsuspension mit der entsprechenden Zellzahl in jede Vertiefung einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Nach 12 Stunden erfolgte die Substanzzugabe durch einen Austausch des Mediums mit einem Medium, welches die entsprechende Substanzkonzentration enthielt. Das Endvolumen bei

Versuchen, die 24 Stunden oder kürzer durchgeführt wurden betrug 100 µl, bei längerer Inkubation wurden 200 µl Endvolumen gewählt. Die Messung wurde durch die Zugabe von 10 µl gebrauchsfertiger WST-Lösung gestartet. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Absorption bei 440 nm gemessen. Zwischen den Messungen wurden die Zellen bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Jeder Messwert wurde vierfach bestimmt. Als Kontrolle wurde auf jeder Platte eine geeignete Substanz mitgeführt, so wurde zum Beispiel Staurosporin bei einer Konzentration von 20 nM für 72 Stunden eingesetzt und Doxycyclin bei 1 µM für 24 Stunden. Die Auswertung erfolgte durch Normierung der Messwerte auf einen Wert mit Zellen und DMSO in der höchsten auf der Platte verwendeten Konzentration als 100% und einen Wert, der nur Medium und DMSO enthielt als 0%. Von den verschiedenen Messungen einer Platte wurde diejenige mit dem höchsten z-Faktor verwendet, wenn gleichzeitig die optische Dichte der Kontrolle ohne Substanz über 0,5 lag.

4.2.6 Anfärbemethoden für die Mikroskopie

4.2.6.1 Immunofluoreszenz-Anfärbung

Färbungen mit fluoreszenten Farbstoffen wurden sowohl in 96-Loch-Platten als auch auf Deckgläschen durchgeführt. Die Zellen wurden dafür zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch eine 20-minütige Inkubation in Fixierpuffer fixiert. Durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für 5 min wurde der Fixierpuffer vollständig entfernt um im nächsten Schritt die Zellen für mindestens eine Stunde in einer Lösung aus 2% BSA in TBS-T zu blockieren. Die für die Färbung genutzten Antikörper, Farbstoffe und fluoreszenten Naturstoffe wurden auch in 2% BSA in TBS-T verdünnt. Die Färbung fand für eine Stunde im Dunkeln statt. Im Falle der auf Deckgläschen gewachsenen Zellen fand die Inkubation in einer feuchten Kammer statt. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Im Falle der Färbung mittels fluoreszierendem Thioestrepton wurde dreimal für je 10 Minuten gewaschen. Bei Färbungen in 96-Loch-Platten wurden die Zellen nun in einer Lösung aus 0,1% Natriumazid in PBS im Kühlschrank gelagert, bis sie mikroskopiert werden konnten. Deckgläschen wurden noch einmal mit doppelt destilliertem Wasser gespült und durch AquaPolyMount (Polysciences Inc., USA) auf Objektträger geklebt. Das

AquaPolyMount härtete über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln aus und die Objektträger wurden bis zur Auswertung bei 4 °C gelagert.

4.2.6.2 Coelestin Blau-Färbung

Für die Coelestin Blau-Färbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei RT mit Fixierpuffer fixiert. Im folgenden Schritt wurden die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen und danach für eine Minute in Coelestin Blau-Lösung inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Zellen wurden für 5 min in 70% Ethanol entfärbt. War der Grad der Entfärbung nicht ausreichend, wurde dieser Arbeitsschritt wiederholt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und auch in PBS bei 4 °C bis zur mikroskopischen Analyse aufbewahrt.

4.2.6.3 Giemsa-Färbung

Für die Giemsa-Färbung wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei -20 °C mit vorgekühltem reinem Methanol fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in einer gebrauchsfertigen Giemsa-Lösung von Carl Roth (Karlsruhe, D) überschichtet. Nach 45 Minuten wurden die Zellen zweimal mit Wasser gespült und in PBS bei 4 °C bis zur mikroskopischen Analyse aufbewahrt.

4.2.6.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für diese Anfärbung wurden die Zellen zuerst mit Hämatoxylin gefärbt (nach Mayer) und anschließend mit Eosin gegengefärbt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min mittels Fixierpuffer fixiert. Die Zellen wurden nun zweimal für 5 Minuten mit PBS und einmal für 5 min mit Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgte durch einminütige Zugabe von Hämatoxylin-Färbelösung (nach Mayer), welche als gebrauchsfertige Lösung von Carl Roth (Karlsruhe, D) bezogen wurde. Die Färbung wurde für 15 min mit ständig erneuertem Wasser entwickelt (gebläut) und anschließend erfolgte für eine Minute die Gegenfärbung mit 0,5% Eosin G-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, D). Es erfolgte im nächsten Schritt eine Entfärbung mit ständig erneuertem Wasser, in dem die Zellen bei 4 °C auch bis zur mikroskopischen Analyse aufbewahrt wurden.

4.2.7 Herstellung von Wnt3a- und L-Zell-Medium

Medium, welches mit Wnt3a angereichert war, diente zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs in zellulären Experimenten. Zur Herstellung wurden Zellen genutzt, die Wnt3a in den Kulturüberstand sekretieren. Als Kontrolle diente eine identische Zelllinie, der allerdings das Transgen zur Wnt3a-Produktion fehlte. Diese Zellen werden L-Zellen genannt. Beide Zelllinien sind über Stammsammlungen erhältlich (Kapitel 3.6.1), wurden in diesem Fall jedoch freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe O. Müller der Abteilung Strukturelle Biologie zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung des Wnt3a- und des L-Zell-Mediums wurden 2×10^5 Wnt3a- bzw. L-Zellen derselben Passage in eine 79 cm² Schale gesät und für vier Tage kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen, bei 4.000 g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend steril filtriert. Nach der Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen für weitere zwei Tage kultiviert. Das Medium wurde wieder abgenommen bei 4.000 g für 5 Minuten zentrifugiert, steril filtriert und mit dem ersten Medium vereinigt. Das so erhaltene Medium war für mehrere Monate in Glasgefäßen lagerbar.

4.2.8 Luziferasebasierte Messung der Wnt-Aktivität

Die verwendete Reporter-gen-Zelllinie wurde von S. Oh bereitgestellt (siehe Kapitel 3.6.1). Für den Test wurden $3,5 \times 10^3$ Zellen in jede Vertiefung einer aus weißem Plastik gefertigten, 96-Loch-Platte (Corning, New York, USA) gesät. Die Zellen hafteten innerhalb von vier Stunden am Boden der Platte an. Es war deshalb möglich, bereits nach vier Stunden das Wachstumsmedium durch Wnt3a-angereichertes Medium mit einer entsprechenden Substanzmenge zu ersetzen. Die Zellen wurden 14 Stunden in Gegenwart der chemischen Verbindung und des Aktivators Wnt3a kultiviert. Es erfolgte anschließend eine Lyse der Zellen durch Zugabe von 30 µl Ripa-Puffer bei Raumtemperatur für 10 Minuten, nachdem das Wachstumsmedium vollständig entfernt worden war. Für die Messung wurde ein Infinite 200M Plattenlesegerät (Tecan, Crailsheim, D) verwendet. Nach Zugabe von 100 µl Luziferase-Reagenz wurde die Messung gestartet. Im Programm zur Messung der synthetisierten Menge von Luziferase-Enzym erfolgte zuerst ein Schritt, in dem für fünf Sekunden mit einer Amplitude von 2 mm linear geschüttelt wurde. Das entspricht bei diesem Gerät einer Geschwindigkeit von

113,7 rpm. Die anschließende Messung erfolgte ohne die Verwendung von Filtern, wobei das Signal pro Vertiefung über den Zeitraum von einer Sekunde integriert wurde. Jede gemessene Konzentration wurde als Vierfachwert bestimmt. Die Normalisierung der Daten erfolgte durch eine Normierung des gemessenen Signals auf nur durch Wnt3a-Medium aktivierte Zellen, die sich auf der gleichen Platte befanden. Es wurden weiterhin auf jeder Mikrotiterplatte immer Zellen mit L-Zell-Medium und mit einem beschriebenen Inhibitor behandelt, um auch die Expression von Luziferase ohne Wnt3a-Stimulation und die Inhibierung der Luziferase-Expression zu überprüfen.

4.2.9 Immobilisierung von Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen

Die Immobilisierung von Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen wurde analog zur Kultivierung von Zellen (Kapitel 4.2.1) durchgeführt. Der mit einer Mikrostrukturierung versehene Glasträger wurde dafür in einer 79 cm² Zellkulturschale mit einer Zellsuspension überschichtet und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen hafteten prinzipiell auch auf der Glasoberfläche. Um die auf den Mikrostrukturen besser haftenden Zellen besser unterscheiden zu können, wurden die Kulturschalen mit den Zellen gegen einen anderen Gegenstand geschlagen. Durch die dabei auftretenden seitlichen Scherkräfte konnten schwach haftende Zellen effektiv von der Oberfläche gelöst werden. Die Färbung und Mikroskopie erfolgte anschließend wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden 3,5 cm Schalen oder 6-Loch-Platten verwendet. Beide Formate haben eine Fläche von 9,6 cm². 500.000 Zellen wurden 12 Stunden vor der Behandlung ausgesät. Die Behandlungsdauer betrug in der Regel vier Stunden und die Zellen wurden danach einmal mit eiskaltem PBS gespült und durch Zugabe von 100 µl eiskaltem RIPA-Puffer lysiert. Nachdem die

Zellen mit RIPA-Puffer für 10 min auf Eis inkubiert worden waren, wurden sie unter Zuhilfenahme eines Zellschabers (Beckton Dickinson; Heidelberg, D) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend homogenisiert. Dies geschah entweder durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle oder durch die Behandlung mit Ultraschall. Für den Aufschluss mittels Ultraschall wurden zwei zehnssekündige Pulse mit 40 Watt (30% Maximalleistung) genutzt, zwischen denen die Probe auf Eis gekühlt wurde. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 15.000 g wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur Proteinbestimmung bei -20 °C gelagert.

4.3.2 Herstellung von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten

Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturschalen angezogen und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl Zell-Waschpuffer wurden die Zellen abgeschabt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Gefäß wurde 5 min bei 4 °C und 7.500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl Zytoplasma-Extraktionspuffer aufgenommen, kurz gevortext und wieder für fünf Minuten bei 4 °C und 7.500 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Proteine des Zytoplasmas und wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet wurde in 200 µl Kern-Extraktionspuffer aufgenommen, zweimal für je fünf Sekunden mit 40 Watt (30% Maximalleistung) Ultraschall behandelt und wieder für fünf Minuten bei 4 °C und 7.500 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Proteine der nukleären Fraktion und wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Fraktionen konnten bei -20 °C gelagert werden.

4.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von M. Bradford

Für die Proteinkonzentration wurde die Methode von M. Bradford angewandt.[123] Dazu wurden 5 µl der Proteinlösung mit 20 µl bidestilliertem Wasser verdünnt, mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und für 10 Minuten inkubiert. Die optische Dichte der Lösung wurde bei 595 nm gemessen und die

Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer BSA-Eichgerade ermittelt wobei der Verdünnungsfaktor zu beachten war.

4.3.4 SDS-Gelelektrophorese

Für Western Blots wurden 30 µg Gesamtzellprotein mit einer entsprechenden Menge 5x SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt und für 15 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden anschließend auf ein diskontinuierliches Gelsystem nach Laemmli[124] mit einem 6% Sammelgel und einem 12,5% Trenngel aufgetragen und bei 25 mA (für Minigele) aufgetrennt. Die Trennung wurde gestoppt, sobald das Bromphenolblau durch das Gel gewandert war.

4.3.5 Immunodetektion von Proteinen

Das Gel wurde mit allen darin enthaltenen Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran in Transferpuffer bei einer konstanten Spannung von 20 V bei Raumtemperatur für 45 min übertragen. Vor der Immunodetektion wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Behandlung mit 2% Slim Fast Schoko, gelöst in TBS-T-Puffer, abgesättigt. Für die Bindung der Antikörper wurde die Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für je zehn Minuten mit TBS-T-Puffer entfernt. Um die Bindung des ersten Antikörpers an das gesuchte Protein nachzuweisen, wurde ein zweiter Antikörper eingesetzt, welcher an den ersten bindet und mit einer Meerrettichperoxidase oder, im Falle des LI-COR Systems, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dafür wurde die Membran mit einer entsprechenden Verdünnung des sekundären Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Nach einminütiger Inkubation der Membran in „Super Signal West Pico Luminol Solution“ (Thermo Scientific, Waltham, USA) wurde die Lichtreaktion der Meerrettichperoxidase durch Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart, D) detektiert. Im Falle des LI-COR Systems konnte der Antikörper direkt durch Einscannen der Membran nachgewiesen werden.

4.3.6 Entfernen gebundener Antikörper von einer PVDF-Membran

Um nach erfolgter Immunodetektion eines Proteins auf der gleichen Membran noch weitere Proteine zu detektieren, mussten zuerst die bereits gebundenen Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden. Dafür wurde die Membran für vier min in Stripping Puffer inkubiert, wobei sie durchsichtig wurde. Anschließend wurde die Membran mit Wasser gespült, bis sie wieder ihre weißliche Farbe erhielt. Die auf diese Weise behandelte Membran musste wieder blockiert werden, um in einer weiteren Immunodetektion eingesetzt werden zu können. Dieses Verfahren konnte zwei- bis dreimal ohne Detektionsverlust durchgeführt werden. Parallel zu der beschriebenen Methode wurde der Restore Western Blot Stripping Puffer von Pierce (Rockford, USA) nach den Angaben des Herstellers mit ähnlichen Ergebnissen eingesetzt.

4.3.7 Affinitätsaufreinigung mittels biotinylierter Substanz

Die Affinitätsaufreinigung mittels biotinylierter Substanz wurde genutzt um die Zielproteine der aktiven Verbindung zu identifizieren. Die aktive Substanz wurde dafür von Dr. Céline Deraeve an eine PEG-Biotin-Einheit gekoppelt. Als Kontrolle wurde die von Dr. Hugo Lachance hergestellte PEG-Biotin-Einheit verwendet. Alle Versuche wurden mit HEK293-Zellysats durchgeführt. Die Zellen waren vor der Lyse vier Stunden mit 25% Wnt3a-Medium behandelt worden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und anschließender Zugabe von 1 ml Lysepuffer pro 75 cm² Wachstumsfläche wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Eine 20-minütige Inkubation auf Eis und das mehrfache Aufziehen des Lysats durch eine Kanüle mit 0,55 mm Durchmesser sorgten für eine vollständige Lyse der Zellen. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 4 °C, wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Für den eigentlichen Pulldown wurden 400 µl einer Suspension von Streptavidin-Eisen-Partikeln (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet. Diese Partikel wurden mittels eines starken Magneten pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 400 µl einer PBS-Lösung, die 10 µM der aktiven Sonde oder der PEG-Biotin-Einheit enthielt, resuspendiert. Eine anschließende

Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 300 rpm sorgte für eine vollständige Beladung des Streptavidins mit den biotinylierten Verbindungen.

Durch einmaliges Waschen der Partikel mit PBS und anschließende Inkubation mit 400 µl Zelllysat für eine Stunde bei 4 °C und 300 rpm wurden die zellulären Proteine an die Sonde und die Kontrolle gebunden. Damit nur affine Bindungspartner aus dem Lysat gereinigt werden, wurde zweimal für zehn Minuten mit Pulldown Lysispuffer mit zusätzlichen 75 mM MgCl₂ gewaschen. Ein anschließender zweimaliger Waschschrift für je zehn Minuten mit 400 µl PBS verbesserte das Laufverhalten der Probe auf der Nano-LC-MS/MS (Agilent, Santa Clara, USA). Die so gewaschenen Proben wurden pelletiert und in 40 µl Zweifach-SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 95 °C und 700 rpm denaturiert und anschließend pelletiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 25 µl davon wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde gestoppt, bevor die ersten Proteine vollständig durch das Gel gewandert waren. Das Gel wurde über Nacht bei Raumtemperatur und 50 rpm mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung gefärbt und am nächsten Tag mittels bidestilliertem Wasser wieder entfärbt und anschließend eingescannt. Die kompletten Proteinspuren der Kontrolle und der Sonde wurden zusammen mit einer BSA-Bande und einem leeren Gelstück in verschieden große Gelteile geschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Besonderes Augenmerk wurde in diesem Schritt auf die Größe der Gelstücke gelegt, da zu große Gelstücke in späteren Schritten nicht von den Lösungen bedeckt werden konnten. Die noch gefärbten Gelstücke wurden zum Entfärben zuerst für 30 Minuten bei 37 °C und 300 rpm in einer Lösung aus 25% Acetonitril in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat geschüttelt. Anschließend wurden sie für 15 Minuten bei 37 °C und 300 rpm in einer Lösung aus 50% Acetonitril in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat geschüttelt. Beide Waschschriffe wurden ein zweites Mal durchgeführt, um die Gelstücke vollständig zu entfärben. Eventuell in den gebundenen Proteinen vorhandene Disulfidbrücken wurden reduziert, indem sie für 45 Minuten bei 37 °C und 300 rpm in 100 µl einer Lösung aus 50 mM DTT in 25 mM NH₄HCO₃ inkubiert wurden. Die Lösung wurde gegen 100 µl 55 mM Iodacetamid in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat getauscht und für eine Stunde bei Raumtemperatur und 300 rpm im Dunkeln inkubiert. Die Gelstücke

wurden anschließend zweimal für je 15 Minuten in 200 µl einer Lösung aus 50% Acetonitril in 25 mM NH_4HCO_3 gewaschen und für zehn Minuten in 60 µl Acetonitril geschrumpft. Der Überstand wurde verworfen und das noch vorhandene Acetonitril wurde anschließend für zehn Minuten im Abzug abgedampft. Die Gelbanden wurden mit 30 µl einer Lösung aus 0,01 µg/ml Trypsin in 25 mM NH_4HCO_3 für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 300 rpm inkubiert, und die Zugabe von 50 µl 25 mM NH_4HCO_3 sorgte dafür, dass die Gelstücke vollständig bedeckt waren. Die nächsten 12 Stunden wurde bei 30 °C und 300 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 30 Minuten bei 0 °C mit Ultraschall behandelt und der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 60 µl Acetonitril zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde mit dem vorherigen kombiniert und in einer Speedvac (Eppendorf, Hamburg, D) eingedampft. Die trockenen Proben wurden an das Team für hochauflösende Massenspektrometrie der Abteilung Chemische Biologie gegeben und von ihnen mittels Nano-LC-MS/MS analysiert und ausgewertet. Die Auswertung der MS/MS-Spektren erfolgte durch Vergleich mit der Mascot-Datenbank wobei eine Fehlertoleranz von 1% beziehungsweise 0,1% zugelassen wurde. Die Ergebnisse wurden in einem Excel-Dokument zusammengefasst, welches dem Vergleich der identifizierten Proteine der PEG-Biotin-Kontrolle mit denen der Sonde diente.

5. Ergebnisse

5.1 Auswahl eines Testsets verschiedenartiger Verbindungen

5.1.1 Erstellung einer Auswahl von Verbindungen für die Testung in verschiedenen zellulären Systemen

Ein wesentlicher Aspekt bei der Entwicklung neuer Testsysteme ist die Auswahl geeigneter Verbindungen. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, gibt es mehrere Ansätze für diese Fragestellung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keiner der bekannten Ansätze gewählt, sondern es wurde ein neues, an die Bedürfnisse angepasstes Verfahren entwickelt.

Dafür stand in der Abteilung eine Sammlung von 32.314 Verbindungen (Stand 28.08.2006) zur Verfügung. Schon zu Beginn des Auswahlverfahrens stand fest, dass ein Computerprogramm für die entscheidenden Schritte genutzt werden sollte. Weder wäre es möglich gewesen, mehrere tausend Verbindungen von Hand zu sortieren, noch wäre so die Objektivität gewährleistet, in dieser Auswahl geeignete von ungeeigneten Molekülen zu trennen. Es wurden deshalb vier Kriterien als Filter vorgesehen, um eine computergestützte Auswahl zu erreichen (Tab. 2).

Tabelle 2: Kriterien für die Auswahl der zu testenden Verbindungen.

Heteroatome sind in diesem Zusammenhang Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel

1. Ist eine Testung der Substanz vorgesehen?
2. Sind 300 µl einer 10 mM Lösung vorhanden?
3. Enthält die Verbindung einen Ring oder ein stereogenes Zentrum oder drei Heteroatome?
4. Hat die Verbindung einen AlogP-Wert ≤ 6 ?

Ein erster Filter war die Frage, ob eine Substanz der Datenbank überhaupt zur Testung vorgesehen war. Einige der gelagerten Verbindungen sind nicht für Testungen geeignet und wurden bereits bei ihrem Eintrag dementsprechend gekennzeichnet. 160 Verbindungen wurden aus diesem Grund aus dem Verfahren entfernt. Ein zweiter Filter war das Volumen der vorhandenen Substanzen als 10 mM Lösungen. Die in dieser Arbeit etablierten Testverfahren wurden zum einen in 96-Loch-Platten durchgeführt und benötigen von daher größere Mengen an Substanz. Zum anderen sollte auch genügend Material für Folgeuntersuchungen

zur Verfügung stehen. Eine einmal erstellte Auswahl an Verbindungen sollte außerdem in mehreren zellulären Testungen verwendet werden. Für die Auswahl wurden deshalb nur Verbindungen gewählt, von denen mehr als 300 µl bei 10 mM vorhanden waren. Dadurch sollte gewährleistet sein, dass auch für weiterführende Untersuchungen genügend Material zur Verfügung stand. 5.304 Moleküle erfüllten dieses Kriterium und wurden deshalb dem nächsten Filter unterworfen. Dieser Filter betraf die chemische Struktur der Verbindung. Eine Verbindung sollte einen Ring (entweder einen Carbozyklus oder einen Heterozyklus) oder ein stereogenes Zentrum oder drei Heteroatome besitzen, um weiterhin in der Auswahl zu verbleiben. Als Heteroatome zählten in diesem Zusammenhang Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel. Der Filter wurde genutzt, um frühe Synthesestufen und fragmentartige Substanzen zu entfernen. Einfach funktionalisierte Carbonsäuren würden zum Beispiel eliminiert, Phenol würde jedoch aufgrund des aromatischen Rings beibehalten werden. Durch diesen Filter wurden 152 Verbindungen eliminiert. Der vierte und letzte genutzte Filter zielte auf die Löslichkeit der Substanzen. Mit der Auswahl sollten zelluläre Prozesse untersucht werden, welche in einem wässrigen Medium ablaufen und weder organische Lösungsmittel noch Detergenzien tolerieren. Da einige Wirkstoffklassen, wie zum Beispiel Antibiotika, eine geringere Löslichkeit als andere Wirkstoffklassen besitzen[2], wurde nicht der von Lipinski genutzte MlogP-Wert von höchstens fünf[9], sondern ein AlogP-Wert von höchstens sechs festgelegt. Der AlogP-Wert basiert wie auch der MlogP-Wert auf einem Algorithmus, der die erwarteten Verteilungskoeffizienten *in silico* abschätzt. Bei diesen Werten handelt es sich um Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten, im Falle des AlogP-Wertes und des MlogP-Wertes ist es der Verteilungskoeffizient von 1-Oktanol zu Wasser. Ein Ansteigen des Wertes von fünf auf sechs bedeutet, dass sich die Substanz mit dem AlogP-Wert von sechs verglichen zur wässrigen Phase 10-mal stärker in der Oktanol-Phase anreichern würde. Der höchste ermittelte AlogP-Wert einer Substanz im Testset lag bei 50. Diese wurde deshalb mit 536 weiteren Verbindungen entfernt. Eine Übersicht über die Verteilung der Löslichkeit gibt Abbildung 8.

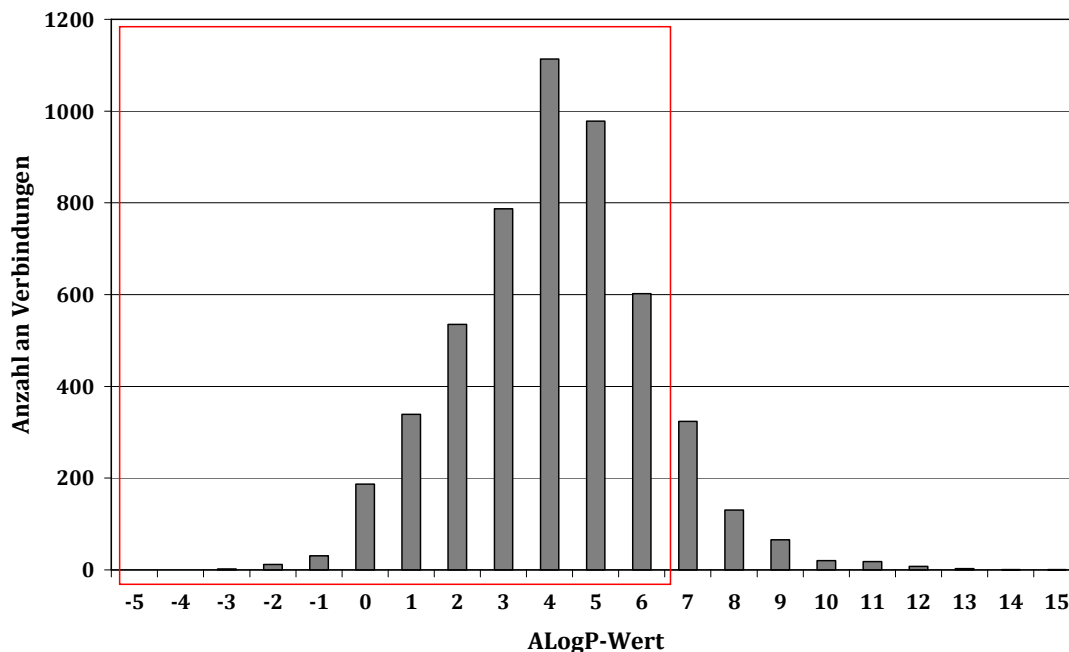


Abbildung 8: Verteilung der AlogP-Werte aller Substanzen mit mehr als 300 µl. Alle Substanzen, die Teil der Auswahl wurden, sind rot umrahmt.

Die Verteilung hat einen Mittelwert von $3,8 \pm 2,0$ und fällt in Richtung höherer AlogP-Werte stark ab, sodass der genutzte Filter die Auswahl der Verbindungen nicht stark einengte.

4.589 Substanzen erfüllten alle Kriterien und eigneten sich deshalb für eine Untersuchung in zellulären Testsystemen. Da die in dieser Arbeit beschriebenen Tests vorwiegend manuell durchgeführt wurden, musste eine Vorauswahl getroffen werden. Dazu wurde in dem Computerprogramm PipelinePilot[125] ein Programm geschrieben, das die Substanzen mittels OptiSim-Algorithmus[126] nach chemischer Ähnlichkeit ordnete und in Gruppen von im Durchschnitt 10 Molekülen sortierte. Dazu wurde für jede Verbindung eine Zahlenreihe erstellt, die verschiedene Eigenschaften des Moleküls wie Atomanzahl und deren Verknüpfungen abbildete. Diese Reihen konnten in einem ähnlichkeitsbasierenden Verfahren durch den Tanimoto-Koeffizienten miteinander verglichen und gruppiert werden. Die Aufgabe für den Computer bestand darin, Gruppen ähnlicher Verbindungen mit im Mittel zehn Mitgliedern zu generieren, weshalb aus 4.589 Substanzen 459 Gruppen erzeugt wurden.

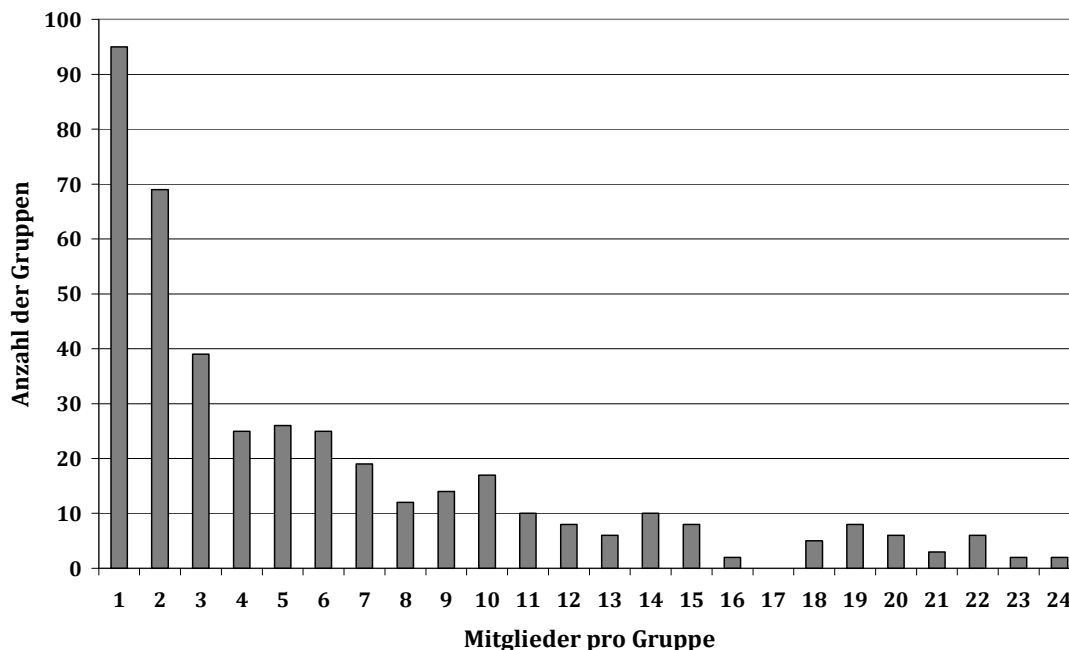


Abbildung 9: Verteilung der Anzahl der Mitglieder pro Gruppe.

Wie in Abbildung 9 gezeigt, haben mehr als die Hälfte der erzeugten Gruppen weniger als sechs Mitglieder; dieser Wert spiegelt die hohe Diversität der Ausgangssubstanzen wieder. Das Computerprogramm fand für diese Substanzen keine weiteren Strukturen mit ausreichend hoher Ähnlichkeit, um sie zu den bestehenden Gruppen hinzuzufügen. Die größte Gruppe in der Auswahl umfasste 131 Mitglieder. Als Kontrolle wurden die 459 Gruppen mit allen Mitgliedern drei erfahrenen Chemikern der Abteilung zur Begutachtung vorgelegt. Die Mitglieder aller Gruppen, die von mindestens zwei Personen beanstandet wurden, sind daraufhin neuen Gruppen zugeordnet worden. Auf diese Art wurden 20 neue Gruppen erzeugt.

Von jeder Gruppe sollte zu Beginn nur die Verbindung mit der höchsten Ähnlichkeit zu allen anderen getestet werden. Die Aktivität dieser Verbindungen in einem Test sollte die besten Rückschlüsse auf die ganze Gruppe zulassen. Dadurch wurden 479 Verbindungen ermittelt, welche in den in dieser Arbeit etablierten zellulären Testsystemen untersucht wurden. Zu jeder Verbindung wurden durch den Auswahlprozess gleichzeitig weitere ähnliche Moleküle gruppiert, die für weitere Tests und erste Struktur-Wirkungsuntersuchungen zur Verfügung stehen würden. Bei der Identifizierung einer aktiven Substanz sollte anschließend die gesamte zugrunde liegende Gruppe getestet werden.

Sowohl die Erstellung geeigneter Kriterien wie auch die endgültige Auswahl wurden in Kooperation mit Dr. Stefan Wetzel durchgeführt.

5.1.2 Validierung der Auswahl mittels vorhandener Daten

Zur Validierung der Auswahl wurden Daten verschiedener bereits abgeschlossener Tests genutzt.

Eine Annahme der Substanzauswahl war, dass Verbindungen mit ähnlicher Struktur auch ähnliche Aktivitäten besitzen. Sollte das getestete Molekül biologisch aktiv sein, ist deshalb anzunehmen, dass auch die anderen Mitglieder der Gruppe eine gewisse Aktivität zeigen. Es war deshalb zu erwarten, dass ein großer Teil der aktiven Substanzen durch die Gruppierung mit anderen ähnlichen Verbindungen auch in einer stark reduzierten Substanzauswahl auffindbar war. Immer vorausgesetzt, dass bei Identifizierung einer aktiven Substanz die ganze Gruppe getestet wird. Durch die Auswahl wurde eine Reduktion der zu testenden Substanzen von 4.589 auf 479 erzielt. Wäre das Auffinden einer aktiven Substanz rein zufällig, läge die Chance bei ungefähr 10%. Dies trifft nicht genau zu, da bei einer aktiven Substanz alle ähnlichen Verbindungen ebenso getestet werden und sich dadurch die Gesamtanzahl der getesteten Verbindungen erhöht. Zum Abschätzen der Tauglichkeit der Auswahl ist eine Rate von 10% aber geeignet, da die zusätzlich zu testenden Gruppen in der überwiegenden Anzahl klein sind. Wie in Tabelle 3 gezeigt, ist die Wahrscheinlichkeit, aktive Verbindungen zu identifizieren, zum Teil deutlich erhöht.

Tabelle 3: Wiederfindbarkeit aktiver Substanzen nach dem Auswahlprozess. Die Daten wurden direkt aus der abteilungseigenen Ergebnisdatenbank extrahiert und beziehen sich nur auf Substanzen mit einem gemessenen IC₅₀-Wert (Stand der Daten: September 2006).

Getestete Aktivität	Anzahl der aktiven Substanzen in der Auswahl der 4.589	Anzahl der auffindbaren aktiven Substanzen nach dem Auswahlprozess	Prozentuales Verhältnis
Enzyminhibition CDC25	357	99	27,7%
Enzyminhibition PTP1b	95	12	12,6%
Enzyminhibition VHR	77	8	10,4%

Enzyminhibition VE-PTP	153	50	32,7%
Enzyminhibition MPTPA	40	7	17,5%
Enzyminhibition MPTPB	451	195	43,2%

Bei der Testung der humanen Phosphatase CDC25 wurden zum Beispiel 679 IC₅₀-Werte bestimmt. 357 dieser Verbindungen waren in der 4.589 Mitglieder umfassenden Auswahl enthalten. Durch das Vorgehen der initialen Testung der kleinen, strukturell verschiedenen Substanzbibliothek und der anschließenden Testung aller Mitglieder der aktiven Gruppen wären 99 der aktiven Substanzen identifiziert worden. Das entspräche 27,7% aller aktiven Substanzen und zeigt, dass trotz der erheblichen Reduktion der zu testenden Substanzen die Wahrscheinlichkeit, aktive Substanzen zu identifizieren, zu einem gewissen Grad erhalten blieb. Die weiteren ausgewerteten Daten ergaben ähnliche Ergebnisse. Es zeigte sich jedoch, dass bei Tests mit einer geringen Anzahl aktiver Moleküle die Auswahl weniger überlegen war, wobei sie aber nie schlechter als eine zufällige Auswahl war. Dennoch ergab der Auswahlprozess eine kleine, strukturell diverse Substanzbibliothek, die für den Einsatz in manuellen biochemischen und zellulären Tests sehr gut geeignet war.

5.2 Einsatz des Testsets zur Identifizierung neuer antibiotischer Verbindungen

Die Verfügbarkeit wirksamer Antibiotika ist eine wichtige Voraussetzung für das Gesundheitssystem. Allein Infektionen der unteren Atemwege waren 2008 weltweit die dritthäufigste Todesursache.[127] Gleichzeitig hatten viele pharmazeutische Unternehmen ihre Forschungen auf diesem Gebiet in den letzten 30 Jahren eingeschränkt oder ganz eingestellt, da sie auf die zu diesem Zeitpunkt entwickelten Antibiotika vertrauten.[128] Erst in jüngster Zeit wurde wieder verstärkt nach neuen Antibiotika gesucht und neue Medikamente zugelassen.[129-132] Oft sind die bei diesen Tests entdeckten aktiven Substanzen

Naturstoffe oder ihre Analoga. Von den ungefähr 22.000 bis 2002 entdeckten Naturstoffen haben 20.000 eine antibiotische Aktivität.[133] Aus diesem Grund verspricht die Untersuchung von Naturstoff-abgeleiteten Bibliotheken eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, neue, potente Verbindungen zu entdecken. In dem in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Testset waren zum einen 85 Naturstoffe oder Naturstoffanaloga der Firma Analyticon enthalten, die zusammen 24 Gruppen bilden, zum anderen lagen den Syntheseprojekten, die Eingang in das Testset gefunden haben, vielfach Naturstoffe zu Grunde. Eine Untersuchung der antibiotischen Aktivität erschien deshalb Erfolg versprechend und wurde als erste Probe der Verbindungsauswahl angesehen. Die durch diese Experimente gewonnenen Daten sollten zeigen, dass das Testset die Identifikation aktiver Substanzen erlaubt und das Zusammenfassen ähnlicher chemischer Verbindungen in Gruppen sinnvoll war. Zuerst wurde im kleinen Maßstab die Durchführbarkeit eines solchen Tests untersucht.

Erste Versuche in Form von Agar-Diffusionstests verliefen erfolgreich und zeigten, dass ein sicherer Umgang mit pathogenen Bakterien unter den gegebenen Umständen gewährleistet werden konnte. Bei diesem Test diffundiert ein Antibiotikum in das feste Wachstumsmedium eines Bakterienstamms und die Wachstumsinhibition wird anhand eines kreisförmigen Hemmhofs um diese Quelle bestimmt. Solche Untersuchungen werden häufig genutzt, um isolierte Erreger in Krankenhäusern auf ihre Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika zu untersuchen.[134] Dabei findet eine Einteilung in suszeptibel, intermediär und resistent statt. Diese grobe Klassifizierung reichte allerdings oft nicht aus, um verschiedene Antibiotika untereinander zu vergleichen. Zwar konnten einmal bestimmte Hemmhöfe reproduziert werden, jedoch zeigte sich kein sinnvoller Zusammenhang zwischen Hemmhofdurchmesser und Konzentration. Die Vergleichbarkeit verschiedener Substanzen untereinander wurde dadurch erheblich erschwert. So führte bei *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) eine 10-fach geringer konzentrierte Penicillin-Lösung zu einem nur um den Faktor fünf reduzierten Hemmhofdurchmesser. Im Falle des Antibiotikums Gentamicin hatte eine Reduktion der Konzentration um den Faktor 100 den Hemmhof bei *Bacillus subtilis* von 1,1 cm auf 0,1 cm verringert. Zudem war der Durchmesser des Hemmhofs auch ganz erheblich von der Nährmediumsmenge, deren Feuchtigkeit und Lagerungsdauer abhängig.

Um ein robusteres Testsystem zu erhalten, wurde die DIN 58940, „Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika“, genutzt. Diese Norm standardisiert die Anzucht und den Einsatz verschiedener Bakterienstämme für die Antibiotikaentwicklung und diente in Bezug auf Bakteriendichte, Inkubationszeit und Substanzeinsatz als Grundlage der hier beschriebenen Arbeiten. Die Tests werden hierbei in 96-Loch-Platten durchgeführt, was die Substanzmenge pro Test reduzierte und auch die Anzahl an parallel zu testenden Substanzen erhöhte. Dem verwendeten Medium, einer Müller-Hinton-Boullion, wurden entgegen der DIN-Norm 2% NaCl zugesetzt. Diese Änderung ist allgemein üblich, da sie zu einer deutlich besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führt.[135,136] Dieser Effekt wurde im Rahmen weiterer Arbeiten ebenfalls beobachtet.

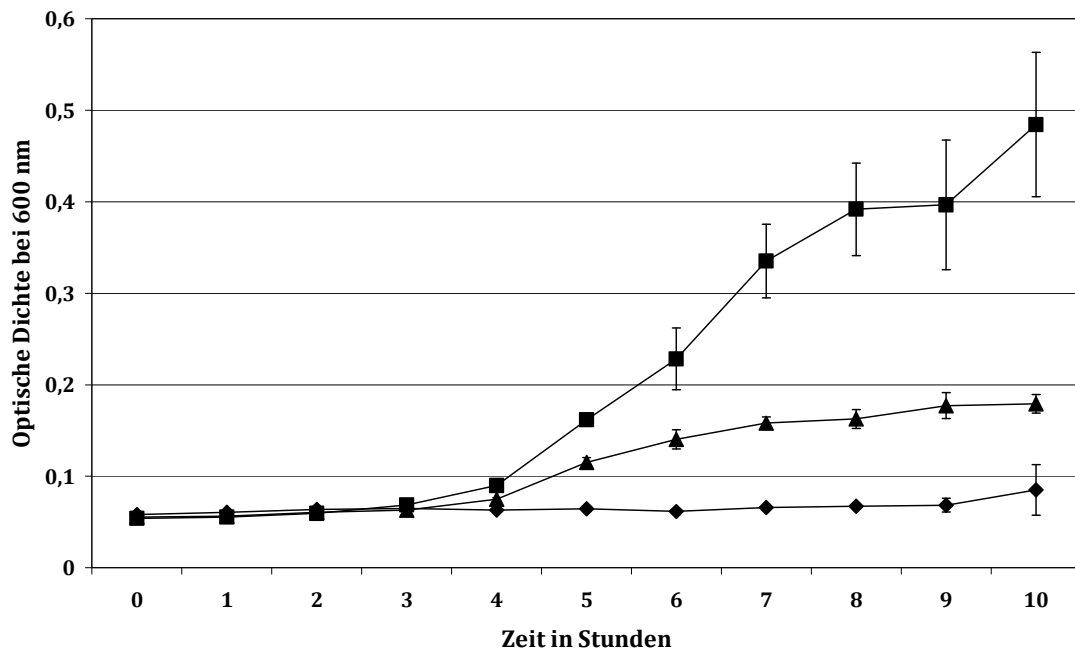


Abbildung 10: Wachstumskurven von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* bei 37 °C in einem Inkubator. Viereck: *E. coli*. Dreieck: *B. subtilis*. Diamant: WachstumsmEDIUM ohne Bakterien.

Wie in Abbildung 10 gezeigt, konnten sowohl gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* als auch grampositive Bakterien wie *Bacillus subtilis* unter diesen Bedingungen kultiviert werden. Beide Stämme zeigen bei diesen Bedingungen von 37 °C in einem Inkubator allerdings nur ein moderates Wachstum. Zudem waren die Schwankungen zwischen den einzelnen Vertiefungen sehr erheblich. Bei *Escherichia coli* (*E. coli*) führten sie zu einer Standardabweichung von 18% nach 9 h Inkubationszeit. Bei *B. subtilis* waren die Schwankungen aufgrund des

langsameren Wachstums mit 8% deutlich besser. Grampositive Bakterien bilden allerdings unter diesen Kultivierungsbedingungen durch ihre Zellwandzusammensetzung Aggregate, was zu weiteren erheblichen Ungenauigkeiten führen könnte. Als wesentlicher Grund für die Inhomogenitäten stellten sich aber ungleichmäßige Belüftungs- und Verdunstungsraten heraus. Die Kultivierungsbedingungen mussten deshalb derart angepasst werden, dass über allen Vertiefungen der 96-Loch-Platte gleiche Bedingungen herrschten. Der Einsatz von System-Duetz-Abdeckungen beseitigte diese Probleme. Bei diesen Abdeckungen handelt es sich im Wesentlichen um sterile Stahlfolien mit je einem Loch für den Gasaustausch pro Vertiefung. Durch diesen Aufbau werden über die gesamte Mikrotiterplatte hinweg gleiche Belüftungs- und Verdunstungsraten erzielt. Zusätzlich war so eine Inkubation im Schüttelinkubator möglich. Dadurch wurden die Bedingungen für die Anzucht der Bakterien deutlich verbessert, wie in Abbildung 11 gezeigt.

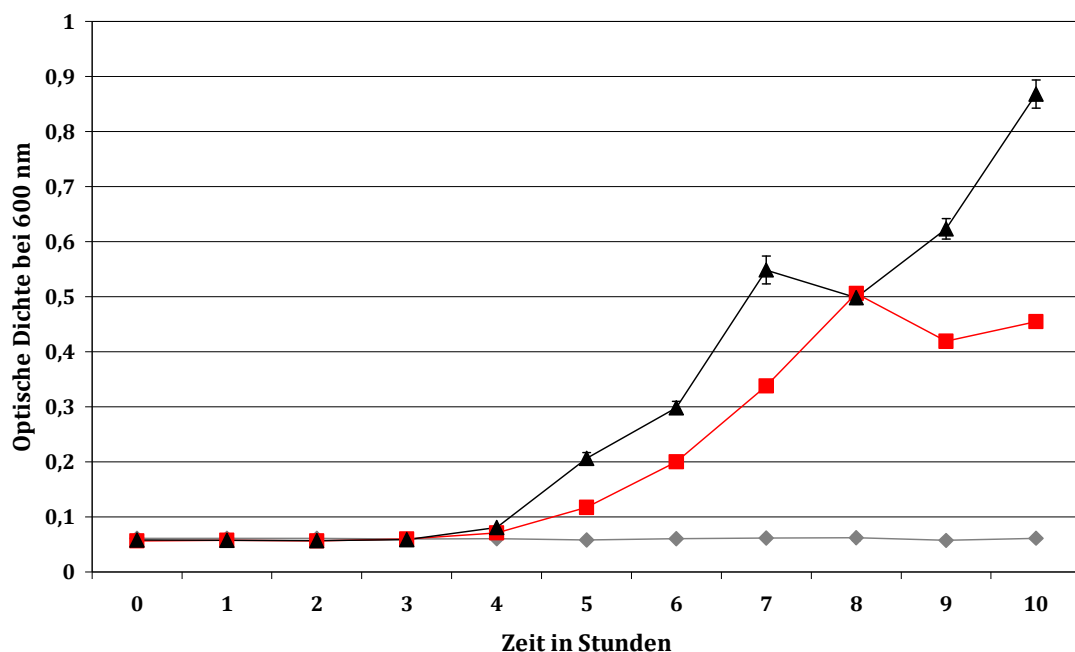


Abbildung 11: Wachstumskurven von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* bei 37 °C und gleichmäßiger Belüftung. Schwarzes Dreieck: *B. subtilis*. Rotes Viereck: *E. coli*. Grauer Diamant: Wachstumsmedium ohne Bakterien.

E. coli wuchs unter diesen optimierten Bedingungen deutlich schneller und erreichte die stationäre Phase bereits nach 8 h, verglichen mit 10 h bei einem Wachstum im Inkubator. Die *B. subtilis*-Kultur zeigte durch die bessere Belüftung der Vertiefungen ebenfalls eine deutlich verbesserte Wachstumsrate. Gegenüber einer optischen Dichte von 0,18 bei 600 nm bei einer Anzucht im Inkubator

erreicht die Kultur unter den verbesserten Bedingungen eine Dichte von 0,87. Nach 7 h stoppte das Wachstum allerdings, um sich nach einer Stunde fortzusetzen. Dieses Verhalten könnte durch Diauxie erklärt werden, hervorgerufen durch das komplexe Nährmedium. Dieser Effekt war nur unter den optimierten Bedingungen zu beobachten. Die Schwankungen zwischen den Vertiefungen waren unter den verbesserten Kultivationsbedingungen für beide Bakterienstämme stark reduziert. Dies wurde besonders deutlich bei Betrachtung der gesamten Mikrotiterplatte, wobei *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) als grampositiver Modellorganismus verwendet wurde (Abbildung 12).

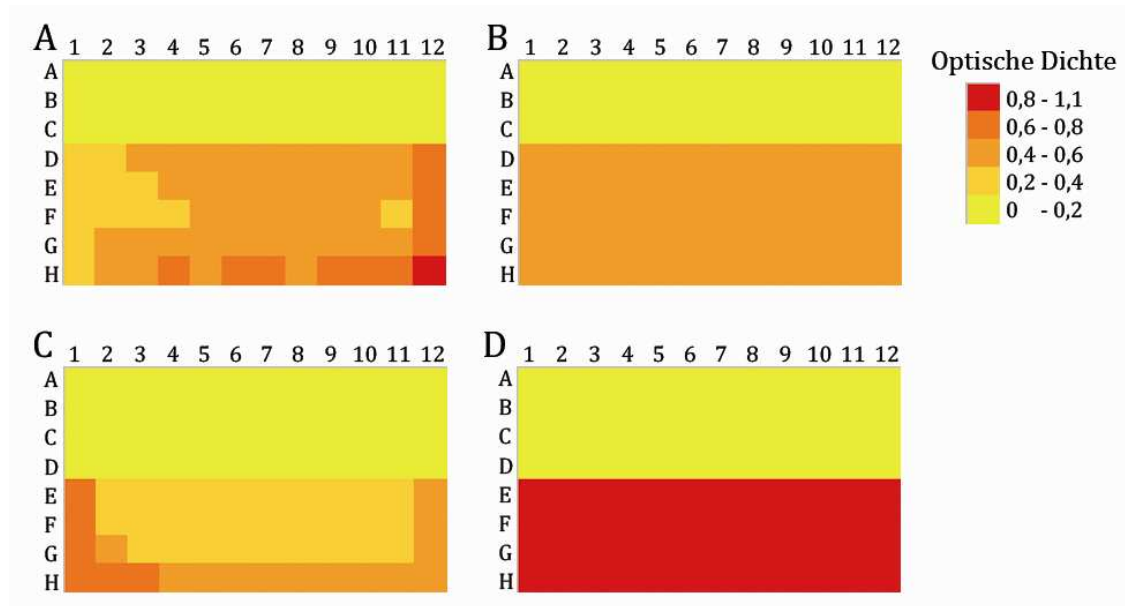


Abbildung 12: Histografische Darstellung des Wachstumsverhaltens in Mikrotiterplatten. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die optische Dichte bei 600 nm als Histogramm dargestellt. A) und B) *E. coli*-Kultur, Vertiefung A1 – C12 Medium, Vertiefung D1 – H12 Medium mit Bakterien. A) *E. coli*-Inkubatorkultur. B) *E. coli*-Schüttelkultur. C) und D) *Staphylococcus aureus*-Kultur, Vertiefung A1 – D12 Medium, Vertiefung E1 – H12 Medium mit Bakterien. C) *S. aureus*-Inkubatorkultur. D) *S. aureus*-Schüttelkultur.

Während der Sauerstoffmangel bei herkömmlicher Inkubation dazu führte, dass nur die Vertiefungen am Rande der Platte ausreichend belüftet wurden (Abb. 12A und C), ermöglichten die Abdeckungen in Kombination mit einer Kultivierung im Schüttelinkubator eine optimale Sauerstoffversorgung aller Vertiefungen und damit ein homogenes Wachstum über die gesamte Mikrotiterplatte (Abb. 12B und D). Der z-Faktor erhöhte sich dadurch, verglichen mit der herkömmlichen Inkubation, von -0,31 auf 0,88 für *S. aureus* und von 0,01 auf 0,86 in Falle von *E. coli*. Der z-Faktor ist ein Maß für die Qualität eines Tests.[137] Der Zahlenwert des z-Faktors wird vom Abstand der Mittelwerte der Kontrollen und ihrer

Standardabweichung bestimmt. Für den idealen Fall von unendlich weit entfernten Mittelwerten oder bei Messwerten ohne Standardabweichungen nimmt er den Wert 1 an, für ungünstige Messungen geht er gegen minus unendlich. Für Hochdurchsatzmessungen wird ein Wert von mindestens 0,4 empfohlen. Mit Werten über 0,8 war das optimierte Testsystem hinreichend stabil, um für die Auffindung neuer Antibiotika eingesetzt werden zu können.

5.2.1 Suche nach mikrobiell wirksamen Verbindungen gegen *Escherichia coli*

Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, ist die Bekämpfung bakterieller Infektionen ein wichtiger Beitrag der chemischen Biologie zum medizinischen Fortschritt. Aus diesem Grund konzentrierten sich die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf krankheitsrelevante Erreger, was noch in Kapitel 6.2 dieser Arbeit näher diskutiert werden wird. Der verwendete *Escherichia coli*-Stamm (DSM Nr. 1103) wird, wie auch alle anderen genutzten Stämme, von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ) als Teststamm zur Identifikation neuer Antibiotika empfohlen. Eine Fokussierung auf solche Referenzstämme sollte einen direkten Vergleich neuer aktiver Verbindungen mit literaturbekannten Antibiotika ermöglichen. Die z-Faktoren lagen bei allen Tests zwischen 0,71 und 0,86. Aus den 479 Verbindungen konnten zwei Substanzen ermittelt werden, die das Wachstum von *E. coli* bei einer Konzentration von 30 μM unterdrückten.

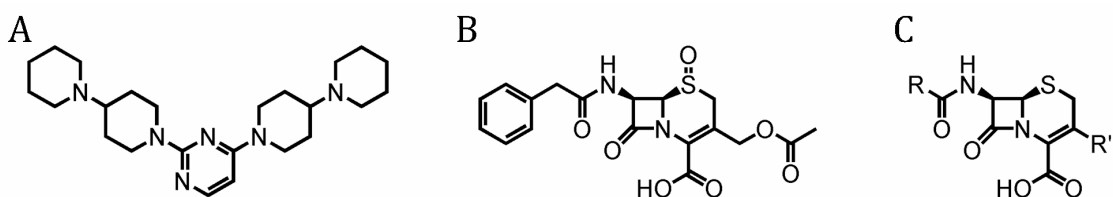


Abbildung 13: Mikrobiell wirksame Verbindungen gegen *E. coli*. A) Substanz SP6790; Mol. Id. 3753. B) Substanz STF0330; Mol. ID. 3977. C) Strukturformel des Cephalosporin-Grundgerüsts.

Die Substanz SP6790 (Abb. 13A) hatte eine minimale inhibitorische Konzentration (MIC) von 30 μM , das bedeutet, dass sie unterhalb dieser Konzentration nicht mehr aktiv war. In der Auswahl befand sich noch eine weitere Substanz mit hoher struktureller Ähnlichkeit, wodurch sie in die gleiche Gruppe sortiert wurde. Bei einer Konzentration von 30 μM zeigte diese

Verbindung jedoch keine Aktivität. Da diese Aktivität mit 30 μM zu gering für weiterführende Experimente war, wurde diese Substanzgruppe nicht weiter untersucht. Bei der zweiten identifizierten Substanz STF0330 (Abb. 13B) handelte es sich um ein Cephalosporin-Derivat, wie der Vergleich mit Abbildung 13C zeigt. Die Cephalosporine bilden eine seit langer Zeit sehr gut untersuchte Antibiotikaklasse.[138,139] Es wurden daher weder für STF0330 noch für die 38 strukturell ähnlichen Gruppenmitglieder MIC-Werte bestimmt. Die Identifizierung des Cephalosporin-Analogons zeigt aber, dass der Test geeignet ist, um neue Antibiotika zu identifizieren.

5.2.2 Suche nach mikrobiell wirksamen Verbindungen gegen *Pseudomonas aeruginosa*

Neben *E. coli* wurde auch *Pseudomonas aeruginosa*, ebenfalls ein gramnegatives Bakterium, untersucht. Unter den untersuchten 479 Substanzen konnte allerdings keine gefunden werden, die das Wachstum bei 30 μM unterdrückte. Selbst eine Reduktion des Wachstums um 50%, was als erster Hinweis für eine antibiotische Aktivität dienen könnte, wurde nicht beobachtet. Die z-Faktoren lagen bei allen Tests zwischen 0,88 und 0,95, was für die Verlässlichkeit der Daten spricht.

5.2.3 Suche nach mikrobiell wirksamen Verbindungen gegen *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii wurde als dritter gramnegativer Bakterienstamm genutzt, um wirksame Verbindungen im Testset zu identifizieren (siehe Kap. 5.1.1). Die z-Faktoren bei allen Tests lagen zwischen 0,92 und 0,98. Eine der 478 Substanzen inhibierte das Wachstum bei 30 μM (Abb. 14).



Abbildung 14: Struktur von Flumequine. Die Substanz wird unter der Bezeichnung AC42 mit der Mol. ID. 5132 geführt.

Bei dieser Verbindung handelt es sich um den Naturstoff Flumequine, einen Vertreter der Fluorchinolone. Die antibiotische Aktivität des Flumequins resultiert aus der Inhibition der Gyrase, einer Topoisomerase vom Typ 2.[140] Fluorchinolone finden in der Human- und Veterinärmedizin breite Anwendung. Eines der bekanntesten Beispiele ist das von der Firma Bayer entwickelte Antibiotikum Ciprofloxacin, welches unter dem Handelsnamen Ciprobay (und Ciproxin) seit mehr als 20 Jahren vertrieben wird. Da der Wirkmechanismus bereits detailliert aufgeklärt wurde, wurde von einer weiteren Untersuchung dieser Verbindung abgesehen.

5.2.4 Suche nach mikrobiell wirksamen Verbindungen gegen *Staphylococcus aureus*

Da das Auftreten Methicilin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) zu erheblichen Problemen im Gesundheitswesen führt[141,142], wurde neben den drei gramnegativen Stämmen (Kapitel 5.2.1–5.2.3) auch ein grampositiver MRSA-Stamm getestet. Die Tests waren mit z-Faktoren zwischen 0,74 und 0,96 außerordentlich stabil. Insgesamt 20 Verbindungen aus fünf Gruppen inhibierten das Wachstum bei 30 μ M. Die repräsentativen Vertreter dieser fünf Gruppen sind in Abbildung 15 dargestellt.

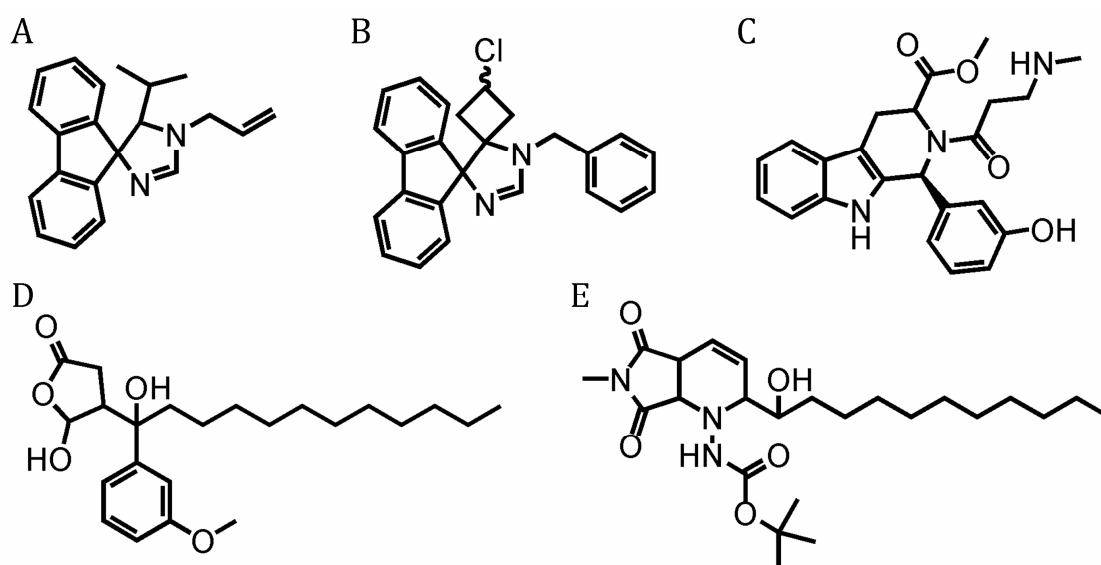


Abbildung 15: Mikrobiell wirksame Verbindungen gegen *S. aureus*. Die Stereochemie der Verbindungen war nicht in der Datenbank hinterlegt. A) Substanz VUAR 031; Mol. Id. 9062. B) Substanz VUAR 029; Mol. ID. 9060. C) Substanz VS-25; Mol. ID. 7444. D) Substanz LW 88; Mol. ID. 4758. E) Substanz A12B11C2; Mol. ID. 51928.

Im zweiten Schritt wurden alle zu den fünf aktiven Substanzen ähnlichen Moleküle aus dem Testset getestet. Es handelte sich um insgesamt 64 Substanzen. VUAR 031 und 029 (Abb. 15A und B) hatten eine minimale inhibitorische Konzentration von 30 und 15 μM . Die Verbindung VUAR 037, eine zu VUAR 031 ähnliche Verbindung, zeigte einen MIC von 7,5 μM und war damit der aktivste Vertreter dieser Strukturklasse. Da jedoch noch wirksamere Substanzen identifiziert wurden, wurde diese Strukturklasse nicht weiter verfolgt. Mit einem MIC von 30 μM zeigte VS-25 keine potenten antibakteriellen Eigenschaften (Abb. 15C). Allerdings gehörten mit einer MIC von je 3 μM die beiden aktivsten Substanzen des Tests zu dieser Strukturklasse. Aus den 45 Vertretern dieser Gruppe konnten dann direkt erste Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden (Abb. 16). Die niedermolekularen Verbindungen LW 88 und A12B11C2 (Abb. 15D und E) zeigten mit einem MIC von 15 und 30 μM keine starke Aktivität und alle zu diesen Strukturen ähnlichen Verbindungen waren inaktiv.

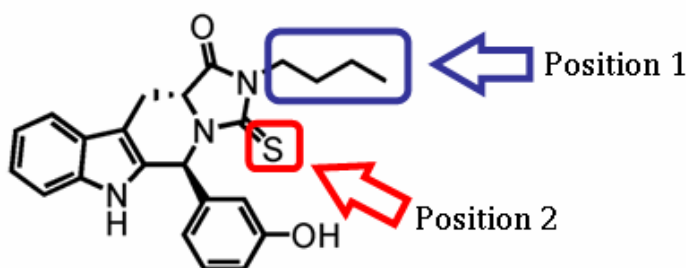


Abbildung 16: Struktur-Wirkungsbeziehung der zu VS-25 ähnlichen Verbindungen. Gezeigt ist die Struktur von NSP 236.

Die in Abbildung 16 gezeigte Verbindung NSP 236 hatte eine MIC von 3 μM , das entspricht 1,2 mg/l. NSP 237 besitzt, verglichen mit NSP 236, die entgegengesetzte Konfiguration an beiden stereogenen Zentren, jedoch wies die Verbindung die gleiche Aktivität auf. Bei Betrachtung der Substituenten an Position 1 wurde deutlich, dass kleinere aliphatische Ketten zu einer Verminderung der Aktivität führten. Ein Ethyl- oder Propen-Rest an dieser Position reduzierte die Aktivität auf 15 μM . Position 2 war noch empfindlicher gegenüber Veränderungen. Eine Keto-Funktion an dieser Stelle inaktivierte das Molekül.

Erste Untersuchungen zeigten, dass die Substanzen bakteriotoxisch wirkten (Abb. 18). Es war jedoch nicht möglich, eine größere Menge von NSP 236 oder 237 zu

erhalten, deshalb konnten keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt werden.

Da eine gewisse chemische Ähnlichkeit zwischen den aktiven Substanzen LW 88 und A12B11C2 (Abb. 15D und E) und einer vorhandenen Bibliothek substituierter Tetramsäuren bestand, wurde diese Bibliothek aus 40 Substanzen ebenfalls in *S. aureus*, *B. subtilis* und *E. coli* getestet. Eine der Verbindungen, TK67A (Abb. 17A), zeigte eine MIC von 12,5 μM (3,1 mg/l) in *B. subtilis* und von 50 μM (12,6 mg/l) in *S. aureus*. Bei der mit einem längeren Acylrest substituierten Tetramsäure TK67B (Abb. 17B) wurde nur noch eine MIC von 250 μM (73,8 mg/l) in *B. subtilis* und von 500 μM (148 mg/l) in *S. aureus* gemessen. Beide Substanzen waren in *E. coli* bis zu einer Konzentration von 1 mM inaktiv. Als Vergleich wurde Reutericyclin genutzt (Abb 17C). Der Naturstoff Reutericyclin wirkt in einem Bereich von 0,27 bis 2,7 μM (0,1 bis 1 mg/l) gegen eine Vielzahl grampositiver Bakterien antibiotisch.[143]

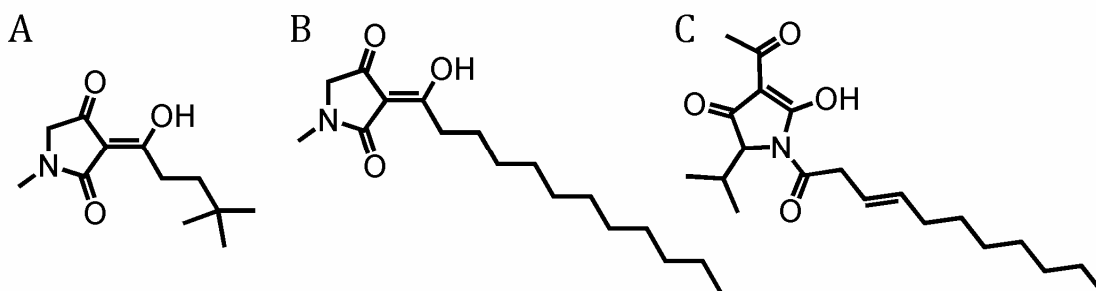


Abbildung 17: Struktur mikrobiell wirksamer Tetramsäuren. A) Struktur von TK67A. B) Struktur von TK67B. C) Struktur von Reutericyclin.

Die für die Tests verwendete DIN-Norm kann bei aktiven Verbindungen nicht zwischen bakteriostatischen und bakteriotoxischen Molekülen unterscheiden. Diese Unterscheidung ist aber sowohl von klinischer als auch von akademischer Relevanz. Im Körper kann ein bakteriostatisches Medikament das Immunsystem bei der Abwehr einer Infektion nur unterstützen, nicht aber den Erreger eliminieren. Wissenschaftlich betrachtet können wiederum viele bekannte Ziele etablierter Antibiotika ausgeschlossen werden, wenn man weiß, welche Art der Wirkung eine Substanz besitzt. Somit könnte solch eine Unterteilung erste Hinweise auf den molekularen Angriffsort einer chemischen Verbindung liefern.

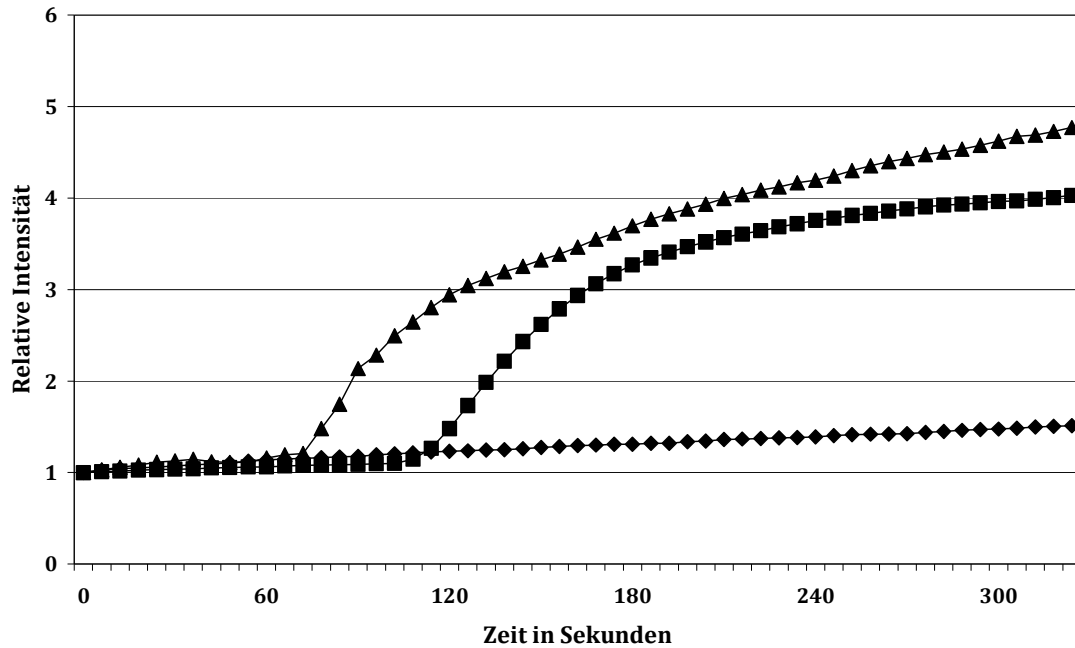


Abbildung 18: Färbung behandelter Bakterienzellen mit Propidiumiodid. Dreieck: Inkubation mit 6 μM NSP236, Zugabe nach 72 Sekunden. Viereck: Inkubation mit 25 μM TK67A, Zugabe nach 114 Sekunden. Diamant: Hintergrund.

Um dies zu untersuchen, wurde die Zellwandintegrität nach Behandlung mit den Verbindungen getestet. Dazu wurden die Bakterienzellen mit dem DNA-anfärbenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid inkubiert und die Fluoreszenzzunahme gemessen (Abb.18). Nach Zugabe von NSP236 oder TK67A stieg die Fluoreszenz in beiden Fällen sprunghaft an. Dies bedeutete, dass Bakterienzellen zerstört wurden, da der nicht zellgängige Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid sonst nicht mit der zellulären DNA in Wechselwirkung treten könnte. Beide Substanzen wirkten also bakteriotoxisch. Im Falle von TK67A wurde diese Wirkung vermutet, da das zur selben Substanzklasse gehörende Reutericyclin diese Wirkungsweise besitzt.[143] Reutericyclin entkoppelt den Protonentransport über der Bakterienmembran und zerstört dadurch aktiv die Bakterienzelle.[144]

Um diesen Mechanismus zu untersuchen, wurde ein Fluoreszenzfarbstoff genutzt, der den intrazellulären pH-Wert der Bakterien messbar machte (Abb. 19) (siehe Kap. 4.1.11). Der Anstieg des pH-Werts vor Substanzzugabe kam durch die Zugabe von Glukose zustande. Dadurch wird der Metabolismus der Zellen aktiviert, was zu einem Strom von Protonen aus der Zelle führt.

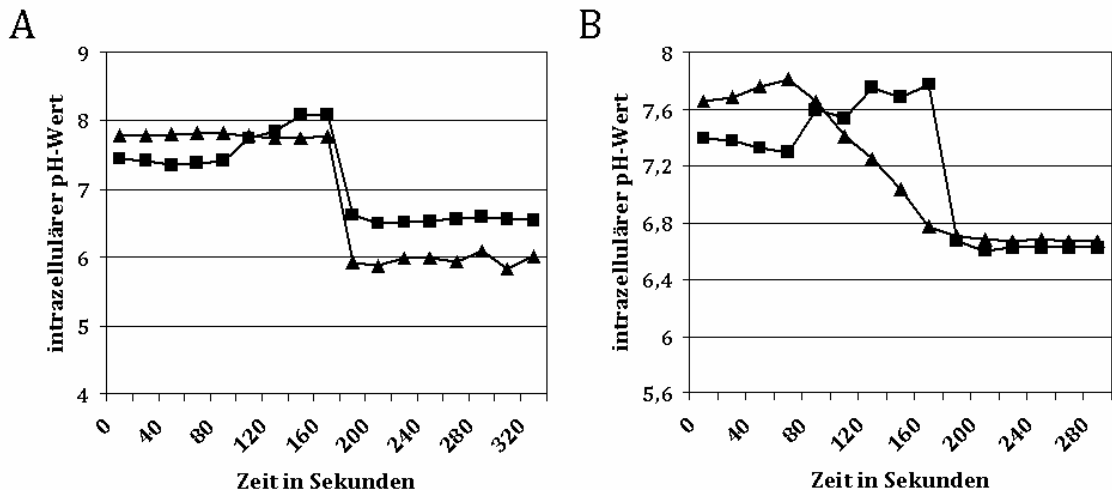


Abbildung 19: Bestimmung des intrazellulären pH-Werts von Bakterienzellen. A) Kontrollen; Dreieck: Inkubation mit 1 µM Nigericin. Viereck: Inkubation mit 1 µM Valinomycin, Zugabe jeweils nach 160 Sekunden. B) TK67A; Dreieck: Inkubation mit 25 µM, Zugabe nach 60 Sekunden. Viereck: Inkubation mit 200 µM, Zugabe nach 160 Sekunden.

Sowohl das wenig selektive Nigericin als auch das selektive Kalium-Ionophor Valinomycin führten in einer Konzentration von 1 µM sehr schnell zum Zusammenbruch des intrazellulären pH-Werts (Abb. 19A). Ampicillin, Tetracyclin und 2,4-Dinitrophenol wurden als zusätzliche Kontrollen genutzt und zeigten ebenfalls die erwarteten Wirkungen. TK67A entkoppelte in einer Konzentration von 25 µM den Protonengradienten (Abb. 19B). Bei der achtfachen Konzentration erfolgt der Ausgleich deutlich schneller verglichen mit der zweifachen minimalen inhibitorischen Konzentration 25 µM (Abb. 19B). Dieses Ergebnis könnte erklären, warum gramnegative Bakterien nicht abgetötet werden. Dort bindet die Substanz an die äußere der beiden Membranen, über der kein Protonengradient liegt. Ein ähnliches Bild ergibt sich in eukaryotischen Zellen, bei denen TK67A vermutlich auch in die Membran inseriert und dann nicht zu den Mitochondrien, über deren innerer Membran der Protonengradient liegt, gelangen kann. TK67A wirkt selbst in hohen Konzentrationen nicht zytotoxisch in der Zellkultur (Abb. 20).

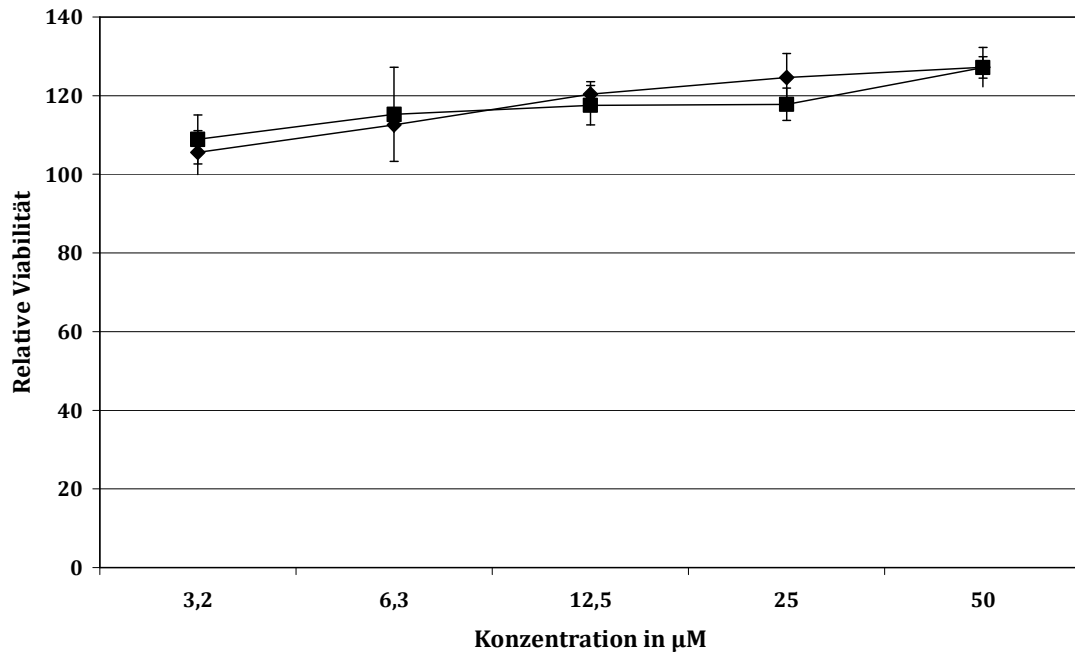


Abbildung 20: Zytotoxizität von zwei Tetramsäuren. Für diese Untersuchung wurden HEK293-Zellen verwendet. Dreieck: Inkubation mit TK67A. Viereck: Inkubation mit TK67B.

Da der Wirkmechanismus von TK67A dem aus der Literatur bekannten des Reutericyclins gleicht, wurden keine weiterführenden Experimente durchgeführt. Abschließend lässt sich aber sagen, dass die Identifikation bekannter Antibiotika die Zuverlässigkeit des Testsystems widerspiegelt.

5.3 Einsatz des Testsets zur Identifizierung von Modulatoren des Wnt-Signalwegs

Die in Abschnitt 3.2 beschriebenen Untersuchungen der antibiotischen Aktivität zeigten, dass das Verfahren zur Auswahl repräsentativer Verbindungskandidaten zur Identifizierung aktiver Substanzen geeignet war. Es wurde daher in einem wesentlichen Forschungsprojekt dieser Arbeit angewandt. Das Ziel war die Identifizierung neuer Modulatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs, wobei sich die Untersuchungen auf den kanonischen Teil des Wnt-Signalwegs, der in Kapitel 1.2.2 genauer beschrieben wurde, konzentrieren sollten. Der Wnt-Signalweg nimmt eine Schlüsselposition in vielen entwicklungsphysiologischen und regenerativen Prozessen ein. Die Regeneration und Erneuerung von Knochen, Haaren, Epithelien oder den Zellen des blutbildenden Systems sind nur

einige Beispiele. Auch schwere Krankheiten wie zum Beispiel Darmkrebs, Nierentumore und Leukämie haben ihre molekularen Ursachen oft in Mutationen des Wnt-Signalwegs.[145] Die Bedeutung dieses Signalwegs bei Alterungsprozessen und in der regenerativen Medizin wird immer deutlicher. Niedermolekulare Modulatoren könnten deshalb sowohl in der Forschung als auch in der Medizin einen erheblichen Nutzen bringen.

5.3.1 Entwicklung eines phänotypischen Tests des Wnt-Signalwegs

Der Name Wnt ist ein Akronym aus Wingless und Int-1. Wingless ist ein Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dessen Mutationen zu schweren Entwicklungsstörungen führen. Unter anderem besitzen diese Tiere zwar noch Halteren, es fehlen jedoch die Flügel.[146] Int-1 wiederum bezeichnet die Stelle im Genom (integration site-1), in der ein MMT-Virus sich in das Genom einer Labormaus integriert hatte. Diese Integration führte zur vermehrten Expression des Proto-Onkogens Int-1 und damit letztendlich zu Brustkrebs.[147] Spätere Forschungen zeigten, dass es sich bei Wingless und Int-1 um zueinander homologe Proteine handelte. Es handelte sich um das später als Wnt3a bezeichnete Protein.

Aus dem Brustgewebe der Labormaus wurde eine immortalisierte Zelllinie erzeugt, die mit dem Tumorgewebe vergleichbare Eigenschaften aufwies. Falls in diesen C57MG-Zellen das Protein Int-1 durch Retroviren[148] oder durch direkte Zugabe[149] aktiviert wurde, zeigten die Zellen ein vermehrtes Wachstum.

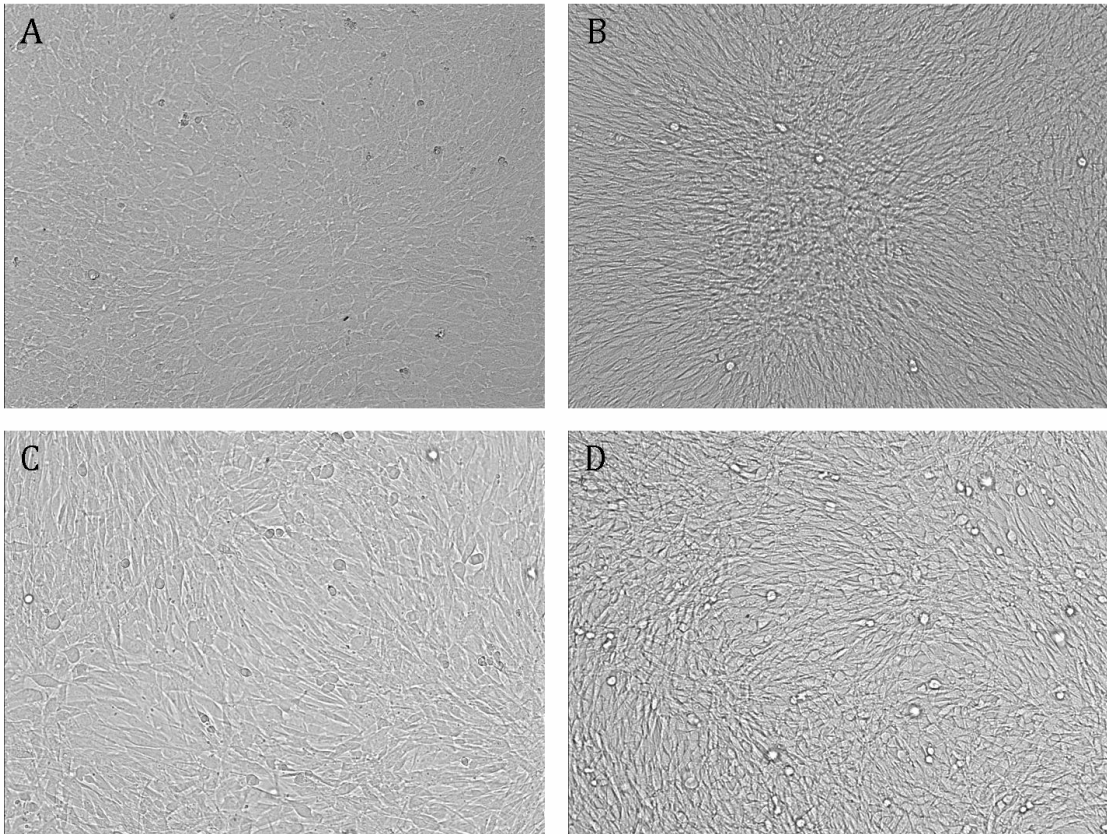


Abbildung 21: Phänotypen behandelter C57MG Zellen. A) unbehandelte C57MG-Zellen. B) Wnt3a-konditioniertes Medium in 75 cm²-Kulturschalen. C) Wnt3a-konditioniertes Medium mit 1 µM PKF118-310. D) Wnt3a-konditioniertes Medium in 0,38 cm²-Mikrotiterplatte.

C57MG-Zellen wuchsen als Epithel, bei dem die Zellen eine geschlossene Fläche bildeten (Abb. 21A). Nach Zugabe von Wnt3a-konditioniertem Medium wuchsen die Zellen unkontrolliert übereinander, in Abbildung 21B ist ein charakteristisches Resultat, ein Zellhaufen, gezeigt. Bei einer Miniaturisierung der Kulturschalen und damit einhergehend einem höheren Grad an Automation blieben diese Zellhaufen aber aus. Die Zellen zeigten zwar nach wie vor ein unkontrolliertes Wachstum, jedoch war der zu beobachtende Phänotyp weniger stark ausgeprägt (Abb. 21D). Durch Zugabe eines Inhibitors des Wnt-Signalwegs konnte ein epitheliales Wachstum wiederhergestellt werden (Abb. 21C). Trotz des schwachen Phänotyps war also eine sichere Unterscheidung zwischen Wnt-Signalweg-aktivierten (Abb. 21D) und -inaktivierten Zellen (Abb. 21C) möglich. Um phänotypische Tests sicher auszuwerten, bedarf es genau messbarer Parameter. Subjektive Parameter werden in einer hohen Anzahl falsch-positiver und falsch-negativer Substanzen münden. Ein verlässlicher Parameter ist die Zellzahl. Epitheliale C57MG-Zellen, die mit einem Int-1-exprimierenden

Retrovirus infiziert wurden, erreichen eine 3- bis 5-fach höhere Zellzahl verglichen mit nicht infizierten Zellen.[148] Aus diesem Grund wurde ein Wachstumstest von C57MG-Zellen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

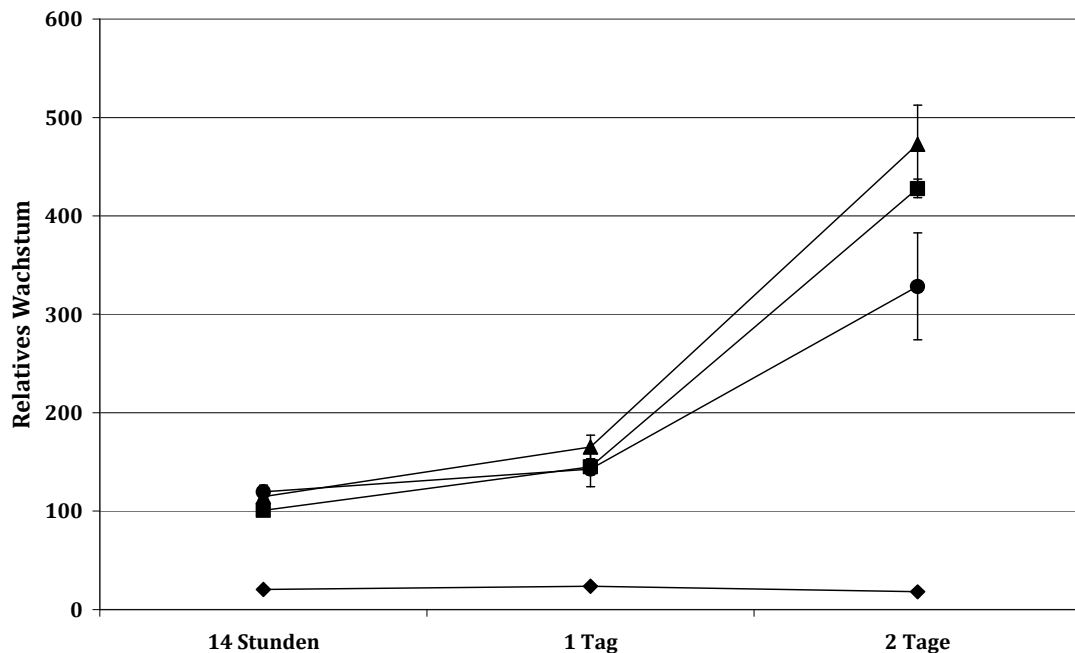


Abbildung 22: Wachstumstest von Wnt-Aktivatoren. Dreieck: Inkubation mit Medium. Viereck: Inkubation mit 1,5 mM Buryrat. Kreis: Inkubation mit 20 mM Lithium. Diamant: Hintergrund.

Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden war die Anzahl der Zellen, die mit Aktivatoren des Wnt-Signalwegs behandelt wurden, geringer als die der Kontrollen (Abb. 22). Dieses Ergebnis wurde mit verschiedenen anderen Aktivatoren, Zellzahlen und späteren Zeitpunkten bestätigt. Der Grund für dieses Ergebnis wurde zum einen in den unterschiedlichen Aktivierungsbedingungen vermutet, zum anderen unterschieden sich die Zellen aber auch in Größe und Form. Während C57MG-Zellen bei 100% Konfluenz als kleine regelmäßige Vielecke erschienen (Abb. 21A), bleiben sie nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs bei ihrer normalen langgestreckten Form (Abb. 21B und D). Die Zellform war nach Aktivierung des Signalwegs deshalb ein deutlich besseres Kriterium als die Zellzahl. Zur Analyse der Zellform wurde die Cellenger-Software (Definiens AG, D) herangezogen, welche für Bilderkennung und automatische Analyse auf dem Gebiet der Multi-Parameter-Tests (high content screening) bereits breite Anwendung fand.

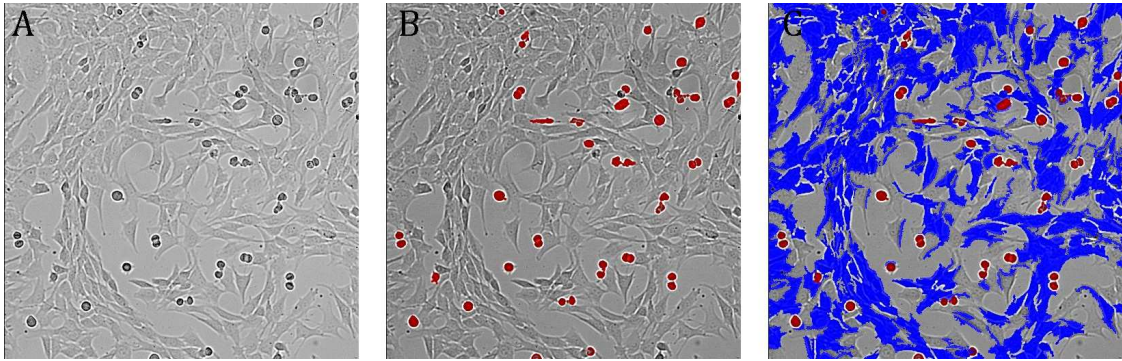


Abbildung 23: Phänotypische Auswertung mittels Cellenger. A) Ausgangsaufnahme von C57MG-Zellen. B) Definition erster Objekte; dargestellt in Rot. C) Definition weiterer Objekte; dargestellt in Blau.

Die Analyse der Bilder wurde durch zwei parallel ablaufende Methoden durchgeführt. Zuerst wurde ein kontrast- und helligkeitsbasiertes Verfahren verwendet, um sich teilende oder absterbende Zellen zu erkennen. Die auf diese Art erkannten Objekte sind in Abbildung 23B rot dargestellt. Ein weiteres Verfahren wurde entwickelt, um die lebenden Zellen zu erkennen. Da die Kontrast- und Helligkeitsunterschiede zwischen Hintergrund und Zellen verhältnismäßig gering waren, wurden mehrere Parameter für dieses Verfahren genutzt. Die Größe der zu definierenden Objekte wurde eingegrenzt und neben dem Kontrast spielten auch Helligkeitsänderungen eine wesentliche Rolle, da der Hintergrund eine homogenere Helligkeitsverteilung als die Zellen aufwies. Das Ergebnis ist in Abbildung 23C blau dargestellt.

Auf diese Weise konnten mehrere Parameter aus einem Test ermittelt werden. Neben der Eigenschaft einer Substanz, den Wnt-Signalweg zu modulieren, konnte die Toxizität und der Prozentsatz der sich in Teilung befindlichen Zellen bestimmt werden. Dadurch würden sich zum Beispiel Verbindungen identifizieren lassen, die den Zellzyklus modulieren.[150] Während die Bestimmung der mitotischen oder toten Zellen mit hoher Sicherheit gelang (Abb. 23B), war die Identifizierung der lebenden Zellen eine große Herausforderung (Abb. 23C). Das Problem bestand darin, ein Erkennungsverfahren zu entwickeln, welches auf der einen Seite akkurat genug war, Zellen sicher zu identifizieren, und auf der anderen Seite flexibel genug, um Bilder unterschiedlicher Qualität zu analysieren. Wie in Abbildung 23C gezeigt, erkannte das Programm den Bildhintergrund mit hoher Zuverlässigkeit. Zellen wurden allerdings mit nur geringer Zuverlässigkeit identifiziert (blaue Objekte in Abb. 23C). Abschließend musste jedoch festgestellt werden, dass es nicht gelang, das Erkennungsverfahren flexibel genug zu

gestalten, damit es mit unterschiedlichsten Bildern sicher arbeitete. Um die Aussagekraft der Bilder zu steigern und homogenere Bilderserien zu erhalten, wurden verschiedene Anfärbungen durchgeführt.

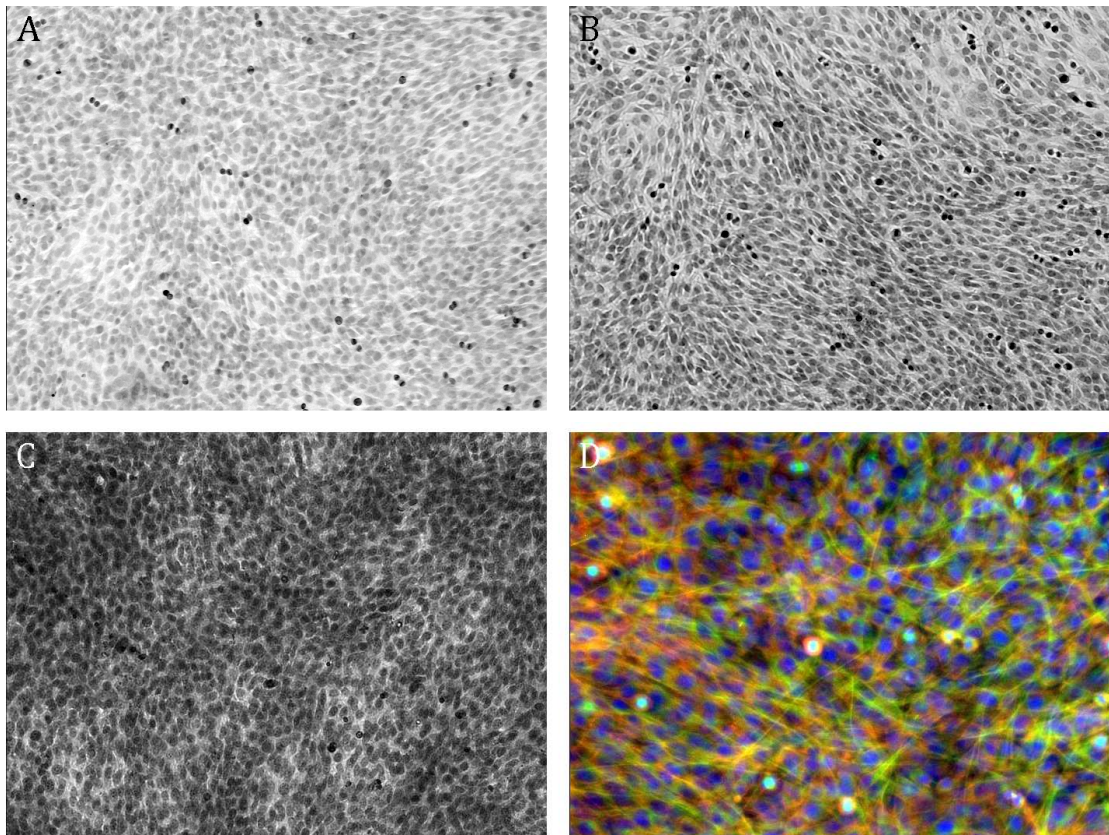


Abbildung 24: Verschiedene Färbungen von C57MG-Zellen. A) Färbung mit Hämatoxylin-Eosin. B) Färbung nach Giemsa. C) Färbung mit Coelestin Blau. D) Fluoreszenzfärbung, Blau: DAPI-Färbung der DNA, Rot: TRITC-Phalloidin-Färbung des Aktin, Grün: FITC-Immundefärbung der Mikrotubuli. A) bis C) 10-fache Vergrößerung. D) 20-fache Vergrößerung.

Von den genutzten Färbemethoden waren Behandlungen mit Hämatoxylin-Eosin, Coelestin Blau und Fluoreszenzmarkern ungeeignet (Abb 24A, C und D). Durch diese Anfärbungen konnten weder die Zellen deutlicher vom Hintergrund getrennt werden noch zeigten sich zusätzliche Charakteristika, die für die Analyse nützlich waren. Die Färbung nach Giemsa (Abb. 24B) erwies sich als besser geeignet, da der Kontrast und die Homogenität zwischen verschiedenen Aufnahmen deutlich gesteigert wurde. Durch den dunkel angefärbten Zellkern und die gut sichtbaren Zellgrenzen wurde auch die automatisierte Identifikation der Zellen vereinfacht. Der Einsatz einer Färbemethode, um auswertbare Datensätze zu generieren, reduzierte allerdings wieder den Durchsatz und erhöhte den manuellen Aufwand deutlich. Das Ziel, einen automatisierbaren Test

für die Untersuchung vieler Substanzen zu entwickeln, war mit dieser Methode nicht direkt zu erreichen.

5.3.2 Entwicklung eines Reporter-gen-basierten Tests des Wnt-Signalwegs

Da die phänotypischen Untersuchungen sich als wenig zuverlässig erwiesen, wurde ein anderes Prinzip gewählt, den Wnt-Signalweg zu untersuchen. Für die weiteren Arbeiten wurde eine auf einem Reporterkonstrukt basierende Detektion genutzt. Diese Methode erwies sich als manuell weniger aufwändig und zeigte eine deutlich überlegene Stabilität. Das Ziel eines auf einem Reporter-gen-basierten Tests ist immer die Sichtbarmachung eines zellulären Ereignisses durch einen Reporter. Im Falle von Signalwegen nutzt man hierfür entweder die Aktivität eines Schlüsselenzyms [151] oder, wie auch im Falle des Wnt-Signalwegs, die Expression eines Zielgens. Die Expression des Zielgens wird dabei mit der Expression des Reportergens verknüpft.[152] Normalerweise werden mehrere Kopien des optimierten Wnt-Promotors vor das Reporter-gen kloniert, um ausreichende Signalstärken zu erzeugen. Eine übliche Anzahl liegt im Bereich von drei bis acht optimierten Kopien.[153,154] Diese Menge ist in natürlichen Systemen nicht anzutreffen. Da ein wichtiger Regulationspunkt des Wnt-Signalwegs auf Ebene der Transkription liegt, stellt sich die Frage, ob solche Reporter ein wirklichkeitsgetreues Signal liefern. Allerdings kann auch die Nutzung ganzer, natürlicher Promotorbereiche von Zielgenen zu falsch-positiven Ergebnissen führen.[155] Als Reporter für den Wnt-Signalweg wurden bereits fluoreszente Proteine[156] und Enzyme wie β -Galaktosidase[152] und Luciferase[154] genutzt. Der Einsatz von Enzymen bietet den Vorteil, dass durch den Umsatz eines Substrats während der Detektion eine Signalverstärkung stattfindet. Diese zusätzliche Verstärkung gab zusammen mit der in der Abteilung bereits vorhandenen Erfahrung den Ausschlag, ein auf Luziferase basierendes Reporterkonstrukt zu nutzen. Eine von Park *et al.* erzeugte Zelllinie erschien hier als besonders geeignet.[119] Diese Zelllinie geht von HEK293-Zellen aus, deren robuste Eigenschaften bereits mehrfach in der Abteilung genutzt wurden. Ein weiterer Vorteil der Zelllinie bestand in der Konstruktion ihres Reporters. Anstelle der oben beschriebenen Ansätze wurde vor das Zielgen nur eine einzige

Kopie des optimierten Wnt-Promotors kloniert. Um dennoch ausreichende Signalstärken zu erzielen, wurde zusätzlich ein Rezeptor des kanonischen Wnt-Signalwegs, humanes Frizzled2, in der Zelllinie überexprimiert. Die Verstärkung des Signalwegs direkt am Rezeptor erschien sinnvoll, da dadurch der gesamte Signalweg mit allen Rückkopplungsschleifen und internen Modulatoren gleichmäßig aktiviert wurde und nicht nur der letzte Schritt des Signalwegs, die Translationskontrolle, überaktiviert war.

Bereits die Vortests zur Ermittlung geeigneter Assaybedingungen zeigten, dass die Zelllinie gut geeignet war.

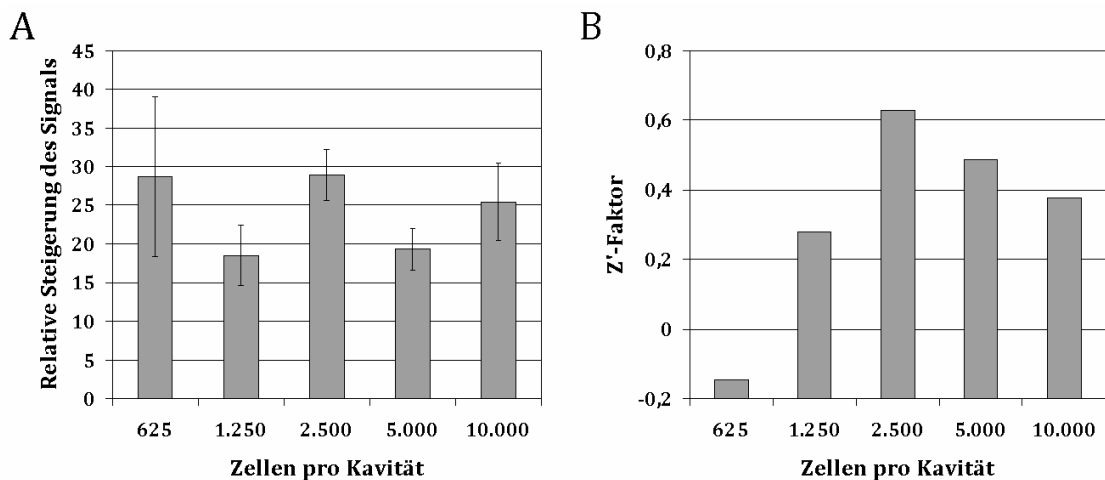


Abbildung 25: Bestimmung der optimalen Zellzahl des Wnt-Reportergen-Tests. A) Erhöhung des Signals relativ zum Hintergrund. B) Z-Faktor der Messungen.

Mit 625 bis 10.000 Zellen pro Kavität ließ sich eine Signalsteigerung auf das 20- bis 40-fache des Hintergrunds erzielen (Abb. 25). Für automatische Tests war eine Zellzahl von weniger als 2.500 Zellen pro Vertiefung allerdings ungeeignet, da die Schwankungen zu groß wurden und die z-Faktoren damit zu niedrig. 2.500 bis 5.000 Zellen pro Kavität waren optimal. Diese Zellzahl ist deutlich geringer als die 20.000 Zellen, die in dem in der Abteilung etablierten Reportergen-Test zur Untersuchung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs eingesetzt wurden.[157] Durch die geringe Zellzahl im Wnt-Reportergen-Test konnte das Wachstumsmedium pro Vertiefung von 200 μ l auf 100 μ l gesenkt werden. Die Belüftung verbesserte sich dadurch deutlich, was zu einer höheren Stabilität des Tests beitrug. In einem repräsentativen Test stieg der z-Faktor dadurch von 0,59 auf 0,69. Ein weiterer Vorteil war der reduzierte Substanzverbrauch je Test. Da zur Durchführung des Tests der Signalweg durch Zugabe von mit Wnt3a-Protein angereichertem Medium stimuliert werden muss, ergaben sich auch in diesem Schritt Einsparungen.

Durch die erhöhte Zahl an Wnt3a-Rezeptoren erwies sich die Zelllinie als außerordentlich sensitiv gegenüber Wnt3a-Protein. Bereits 1,2 ng/ml führten zu einer 4-fachen Steigerung des Signals.

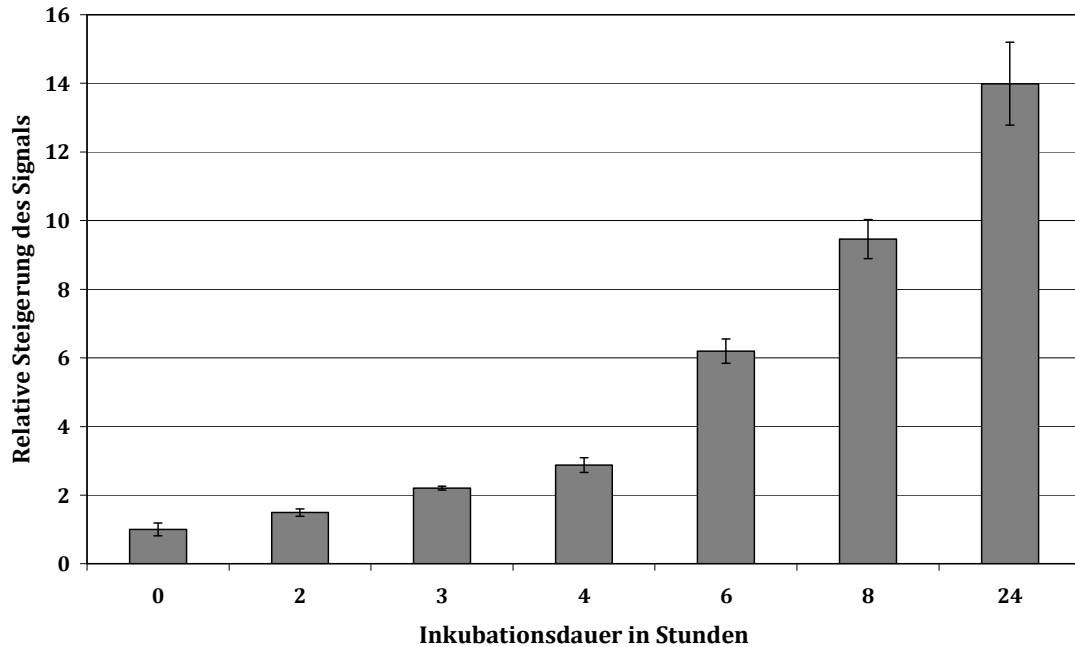


Abbildung 26: Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer des Wnt-Reporter-Tests. Aktivierung durch 50 ng/ml Wnt3a-Protein.

Bei Aktivierung des Signalwegs mit 50 ng/ml Wnt3a-Protein stieg das Reporter-Signal in den ersten acht Stunden (Abb. 26) stark an, wobei alle vier Stunden eine Verdreifachung zu beobachten war. Zwischen 8 und 24 Stunden nach Aktivierung erreichte die Luziferaseaktivität eine Sättigung, da nur noch ein Zuwachs um das 0,5-fache zu beobachten war. Eine Inkubation von 14 Stunden war deshalb ausreichend, um eine gute Signalstärke zu erhalten.

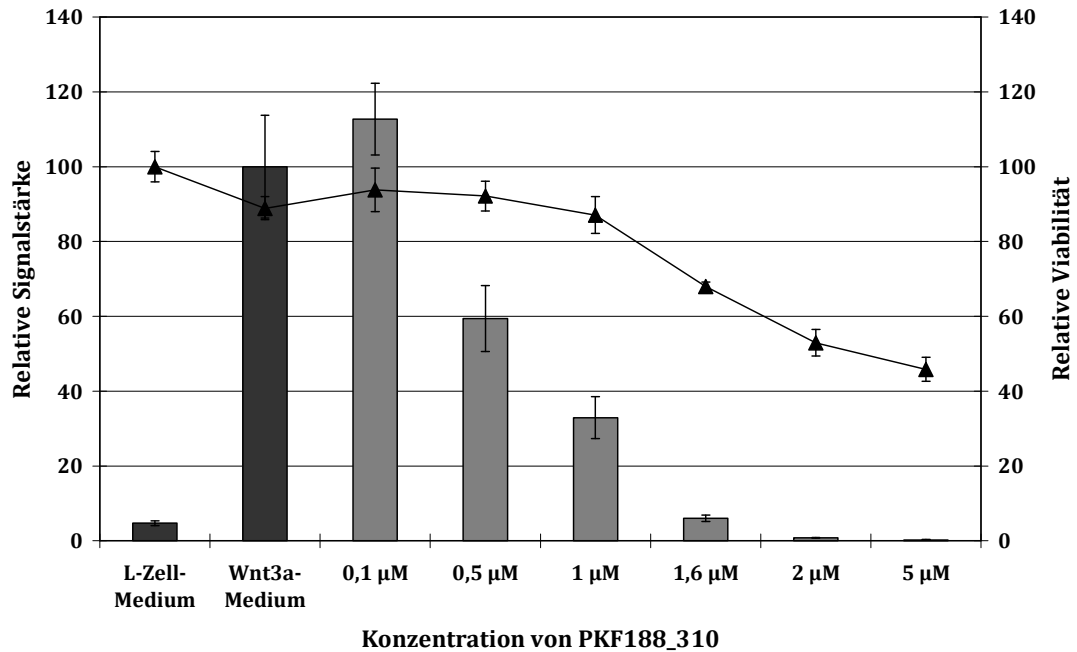


Abbildung 27: Verhalten des Wnt-Reportergen-Tests bei Inhibition. Aktivierung durch konditioniertes Medium (Wnt3a-Medium) und Medium als Kontrolle (L-Zell-Medium). Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch die Kontrollen ist als schwarzer Balken dargestellt. Die Modulation der Wnt-Signalwegsintensität nach Zugabe von PKF188_310 ist als grauer Balken dargestellt. Die Viabilität der Reporter-Zelllinie nach Zugabe von PKF188_310 ist als durch eine Linie verbundenes schwarzes Dreieck dargestellt.

Mit diesen Bedingungen ließ sich ein stabiles Testsystem etablieren. Um die sichere Identifikation von Inhibitoren zu gewährleisten, wurde zunächst ein bekannter Inhibitor untersucht. Der Inhibitor PKF118_310 wurde von M. Lepourcelet *et. al.* identifiziert.[158] In einem ELISA-ähnlichen Verfahren hatten sie aus 7.000 Naturstoffen 12 identifiziert, die die Bildung zwischen TCF4 und β -Catenin inhibieren konnten. Die Substanz war mit einem IC_{50} -Wert von $0,8 \mu\text{M}$ die zweitaktivste, in der Zellkultur erwies sich dieses Purinanaloga aber bei Konzentrationen über $1,5 \mu\text{M}$ als giftig. Das in Abbildung 27 gezeigte Wirkungsspektrum stimmt mit den Literaturdaten überein.[158]

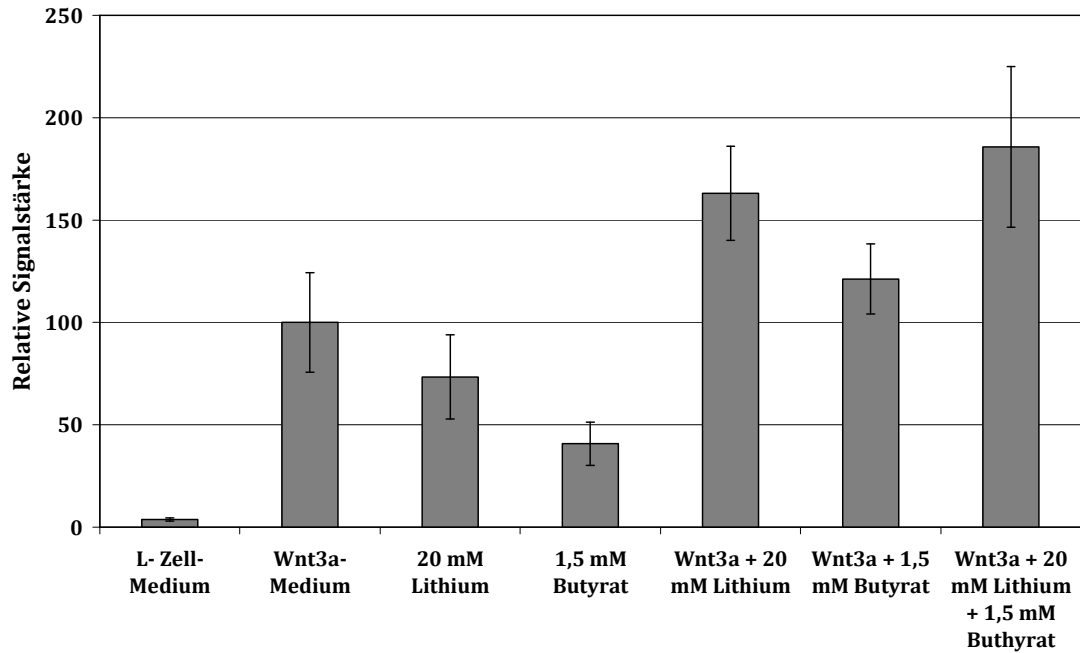


Abbildung 28: Verhalten des Wnt-Reportergen-Tests bei Aktivierung. Aktivierung durch konditioniertes Medium oder andere Aktivatoren, die dem Medium zugesetzt wurden. Die Aktivierung durch ein konditioniertes Medium wurde auf 100% gesetzt. Gegenüber der Kontrolle mit dem L-Zell-Medium handelt es sich um ein 30-fach stärkeres Signal.

Auch die Identifizierung von Aktivatoren war mit diesem Testsystem möglich, wie Abbildung 28 zeigt. Sowohl Lithium[159] als auch Butyrat[160] sind Aktivatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs. Beide Substanzen erhöhen die Luziferaseproduktion unter den Testbedingungen. Wurden die Zellen gleichzeitig mit einem Wnt3a-haltigen Medium und einem der Aktivatoren inkubiert, zeigte sich ein synergistischer Effekt, der bei Inkubation mit beiden Aktivatoren und Wnt3a-Medium am stärksten war.

Durch den optimierten Luziferase-basierten Reporter-Test war es möglich, nach Modulatoren des Wnt-Signalwegs zu suchen. Der Test war schnell, mit hoher Zuverlässigkeit und geringem Substanzverbrauch durchführbar.

5.3.3 Einsatz des Reporter-Tests zur Identifizierung von Modulatoren des Wnt-Signalwegs

Die Zelllinie konnte erfolgreich eingesetzt werden, so dass neben den 479 Verbindungen des Testsets auch die Gruppen der aktivsten Verbindungen

getestet wurden. Insgesamt handelte es sich dabei, zusammen mit den konzentrationsabhängigen Tests, um 809 Vierfachbestimmungen. Die mittlere Standardabweichung dieser Messungen lag bei 11,6%. Die z-Faktoren aller Messungen waren mit $0,71 \pm 0,11$ ebenfalls sehr gut.

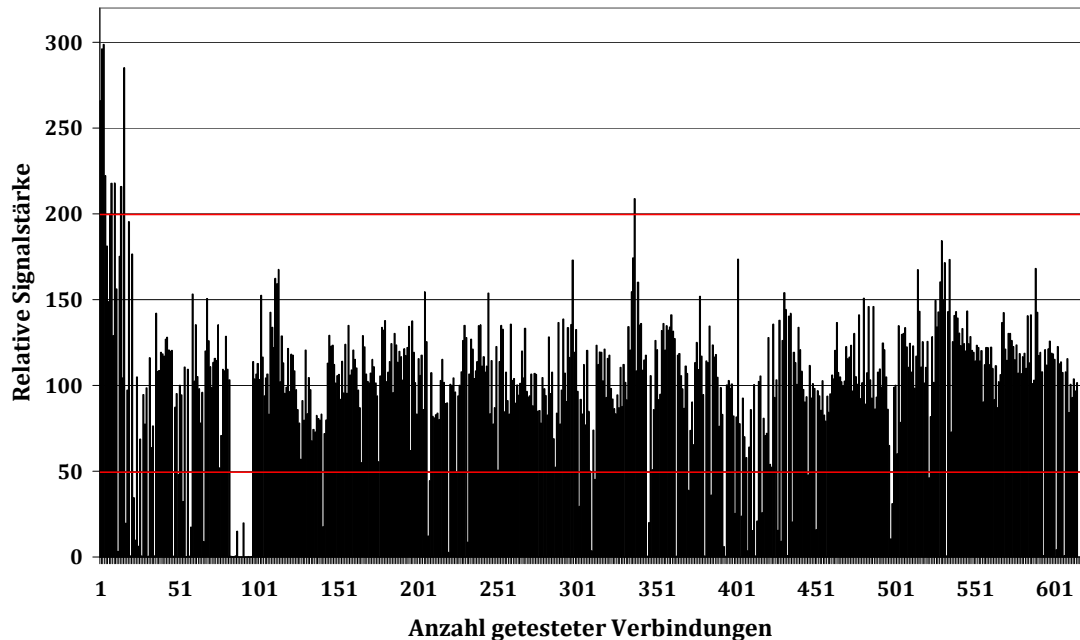


Abbildung 29: Ergebnis des primären Wnt-Reportergen-Tests. Substanzen, deren Aktivität in den rot markierten Bereichen lag, galten als aktiv. 615 Substanzen wurden im primären Wnt-Reportergen-Test bei $30 \mu\text{M}$ untersucht; davon waren 479 Substanzen aus dem Testset und 136 aus anderen Substanzbibliotheken

Bei Betrachtung der Ergebnisse des primären Tests fiel auf, dass die aktiven Verbindungen in Gruppen aufzutreten schienen (Abb. 29). Diese Häufung war rein zufällig, da die Belegung der Mikrotiterplatten nicht nach strukturellen Gesichtspunkten, sondern nach den Lagerorten der Substanzen optimiert wurde. Des Weiteren fiel auf, dass deutlich mehr aktive Substanzen identifiziert werden konnten als in den mikrobiellen Tests. Zehn Verbindungen aktivierten den Signalweg um mehr als das Doppelte und 68 Verbindungen reduzierten das Luziferase-Signal um mindestens die Hälfte. Generell gab es allerdings weit mehr Verbindungen, die den Signalweg aktivierten. 228 Verbindungen zeigten eine Aktivität von mindestens 115% der Kontrolle. Dagegen zeigten nur 140 Substanzen einen inhibitorischen Effekt von höchstens 85% verglichen mit den Kontrollen. Alle Daten wurden in der abteilungseigenen Datenbank hinterlegt. Die

aktivsten Modulatoren wurden genauer untersucht und diese Ergebnisse sollen im Folgenden vorgestellt werden.

5.3.4 Untersuchung eines Inhibitors des Wnt-Signalwegs

Mit einer Restaktivität von 0,3% bei 30 μM war SR56 einer der aktivsten Inhibitoren, die im Testset identifiziert werden konnten (Abb. 30).

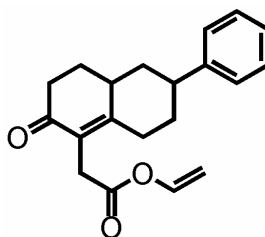


Abbildung 30: Beschriebene Struktur von SR56. Die Mol. ID. der Substanz ist 7093. Die Konfiguration der Stereozentren war nicht in der Datenbank hinterlegt und konnte auch nicht bestimmt werden.

Die Verbindung war nicht toxisch. Bei einer Konzentration von 30 μM betrug die Viabilität der behandelten Zellen $95,7 \pm 2,2\%$ der Kontrollen. Auch das Reporterenzym des Tests, Luziferase, wurde nicht durch die Substanz inhibiert, wie separate Untersuchungen der Enzymaktivität zeigten.

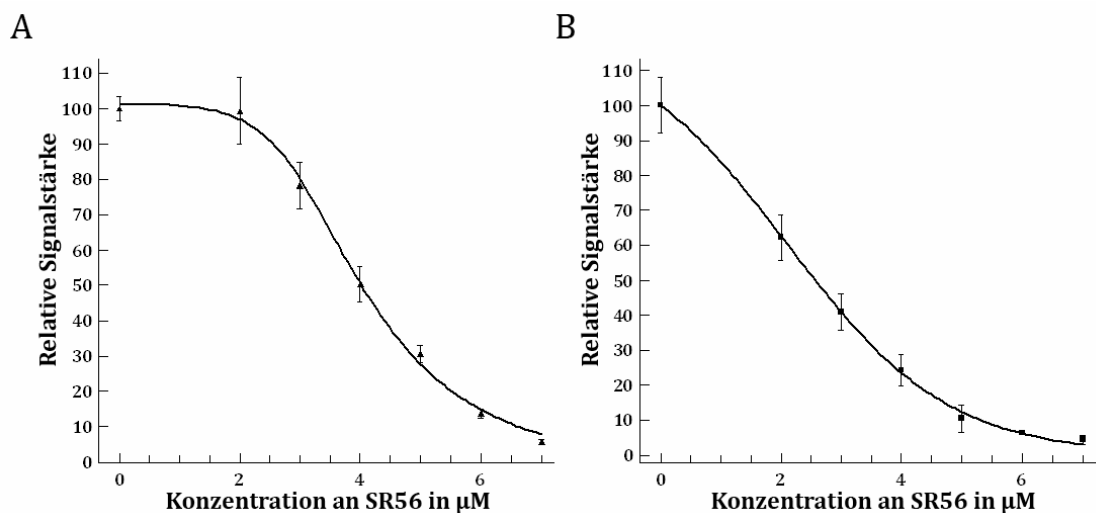


Abbildung 31: Aktivität von SR56. A) Aktivität von SR56 nach Behandlung der Zellen mit Wnt3a-angereichertem Medium. B) Aktivität von SR56 nach Behandlung der Zellen mit 20 mM Lithium.

In Abbildung 31 ist die Aktivität von SR56 gezeigt. Der ED_{50} -Wert der Wnt-aktivierten Messung lag bei $3,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Der ED_{50} -Wert wird anstelle des IC_{50} -Wertes genutzt, wenn das molekulare Ziel der Substanz nicht bekannt ist. Dieser

Wert war ausgesprochen stabil. In drei Messungen wurden jeweils $2,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $3,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ und $4,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ gemessen. Die Standardabweichungen sind bei dieser Substanz außerordentlich gering. Der ED_{50} -Wert der Zellen, die mit Lithium aktiviert wurden, lag mit $2,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ im gleichen Bereich. Ähnliche Ergebnisse wurden mit 6-Bromindirubin-3'-oxim einem im Vergleich zu Lithium spezifischen GSK-3 β -Inhibitor erzielt. Um eine Struktur-Wirkungsbeziehung zu bestimmen, wurden 48 zu SR56 ähnliche Verbindungen, welche im Testset enthalten waren, zusätzlich getestet. Zudem wurden noch 272 weitere Dekaline aus der Substanzdatenbank der Abteilung getestet. Abbildung 32 zeigt die zwei aktivsten der 45 aktiven Verbindungen.

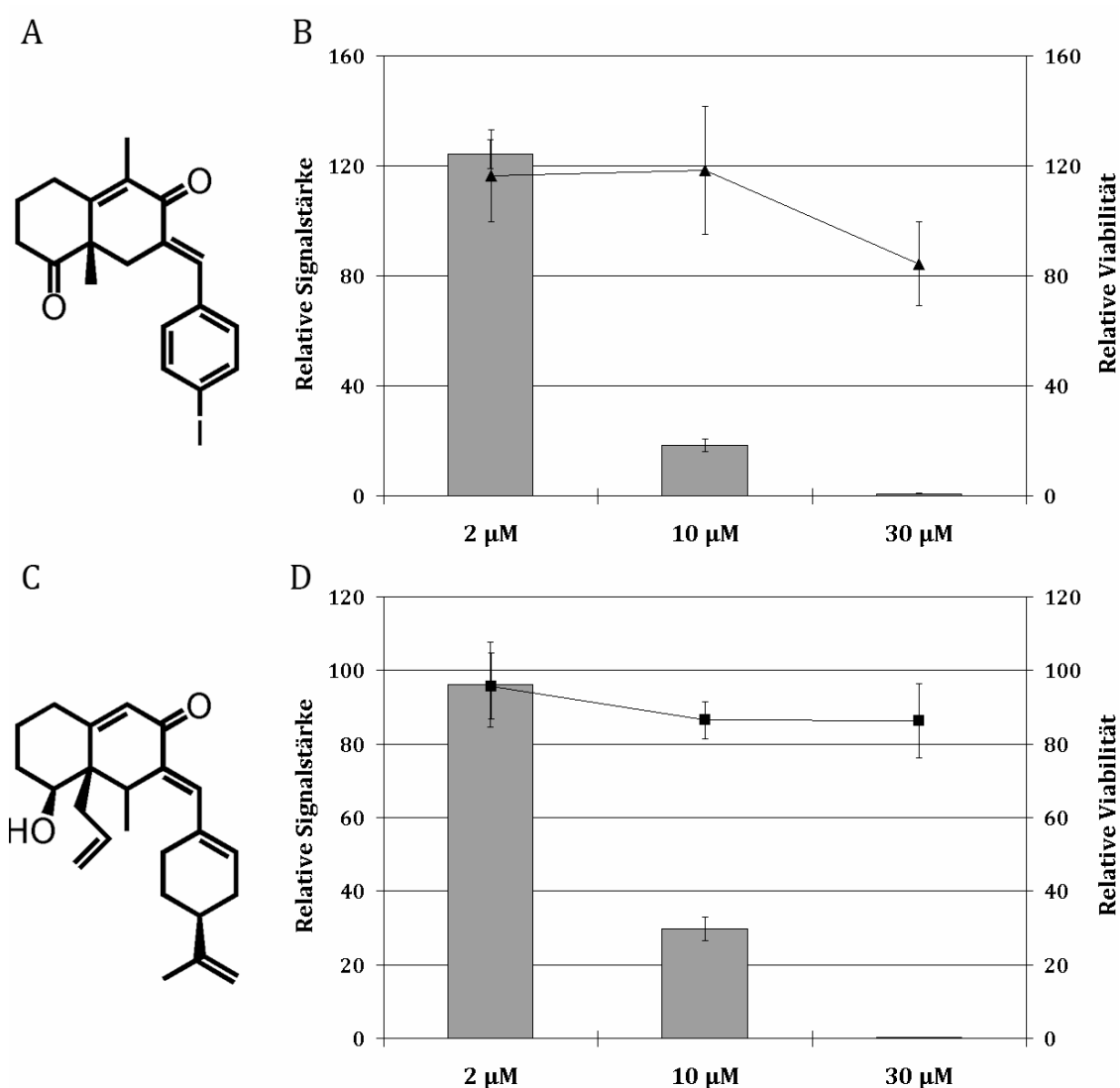


Abbildung 32: Struktur und Aktivität der aktivsten Dekaline. A) Struktur von MS_326; Mol. ID. 6883. B) Aktivität von MS_326 nach Aktivierung mit konditioniertem Medium. C) Struktur von MS_092; Mol. ID. 6649. D) Aktivität von MS_092 nach Aktivierung mit konditioniertem Medium. B) und D) Relative Signalstärke als Balkendiagramm, relative Viabilität als Liniendiagramm.

Es zeigte sich in späteren Untersuchungen jedoch, dass die in der Datenbank hinterlegte chemische Struktur von SR56 falsch war. Die Struktur-Wirkungsbeziehungen mussten aus diesem Grund verworfen werden. Im nächsten Schritt wurde mit Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkung begonnen. Hierzu wurden verschiedene zelluläre Experimente durchgeführt. Zuerst wurde untersucht, ob die im Reporter-gen-Test gewonnenen Erkenntnisse auch in nicht transformierten HEK293-Zellen reproduziert werden konnten.

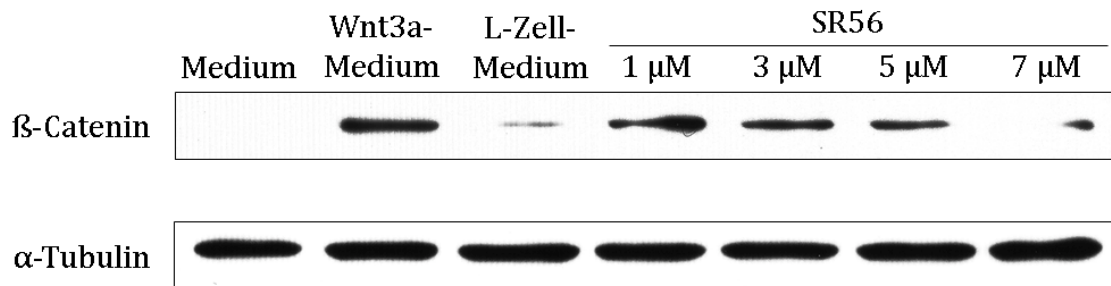


Abbildung 33: Western Blot von SR56 in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden für 14 Stunden mit der Substanz inkubiert. Die β -Catenin-Menge zeigt den Grad der Aktivierung des Wnt-Signalwegs. α -Tubulin wurde als Ladungskontrolle genutzt. Wnt3a-Medium und L-Zell-Medium dienten als Kontrollen des Wnt-Signalwegs.

Dabei zeigte sich, dass die Aktivität von SR56 nicht nur in der auf HEK293-Zellen beruhenden Reporter-gen-Zelllinie, sondern auch in Wildtyp-HEK293-Zellen reproduzierbar war (Abb. 33). Der aus dem Western Blot densitometrisch bestimmte ED_{50} -Wert lag bei $6,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Damit war er etwas höher, als die aus den Werten des Reporter-gen-Tests ermittelten Konzentrationen. Mögliche Ursachen könnten in der unterschiedlichen Detektionsweise der Wnt-Signalstärke liegen oder in einem unterschiedlichen Verhalten der Frizzled2-überexprimierenden Reporter-gen-Zelllinie. In der Darmkrebszelllinie SW480 hat die Substanz mit einem densitometrisch ermittelten ED_{50} -Wert von $5,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$ eine ähnliche Aktivität wie in den HEK293-Zellen (Abb. 34).

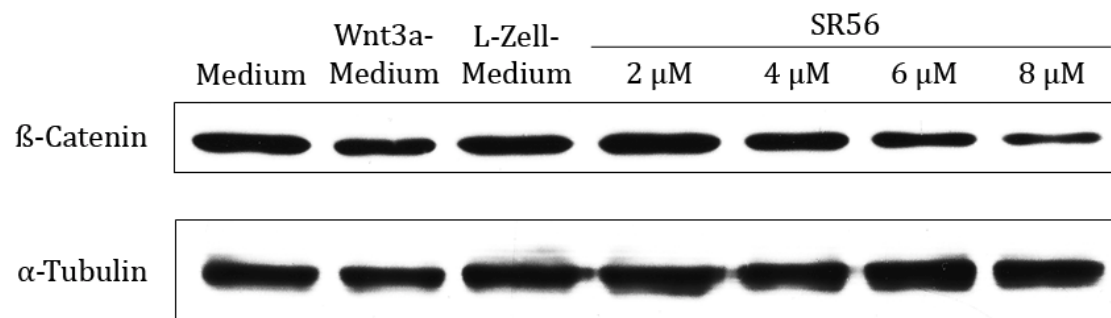


Abbildung 34: Western Blot von SR56 in SW480-Zellen. Die Zellen wurden für 14 Stunden mit der Substanz inkubiert. Die β -Catenin-Menge zeigt den Grad der

Aktivierung des Wnt-Signalwegs. α -Tubulin wurde als Ladungskontrolle genutzt. Wnt3a-Medium und L-Zell-Medium dienten als Kontrollen des Wnt-Signalwegs. Dass SR56 in den SW480-Zellen (Abb. 34) und auch in der mit Lithium aktivierten Reporter-gen-Zelllinie (Abb. 31B) den Wnt-Signalweg inhibierte, ließ erste Rückschlüsse auf die Zielproteine zu. In SW480-Zellen ist der Wnt-Signalweg konstitutiv aktiv, was auf eine Mutation des APC-Proteins zurückzuführen ist.[161] Durch diese Mutation kann β -Catenin nicht mehr effizient phosphoryliert und abgebaut werden. Lithium-Ionen aktivieren den Wnt-Signalweg durch Inhibition des Proteins GSK-3 β , was ebenso zu einer verminderten β -Catenin-Phosphorylierung führt. Wenn jedoch trotz Aktivierung des Signalwegs auf der Ebene der β -Catenin-Phosphorylierung eine Inhibition zu beobachten ist, muss der Inhibitor unterhalb dieses Prozesses in den Signalweg eingreifen. Für SR56 bedeutete das, dass sich die Wirkung durch Modulation des Transports von β -Catenin in den Zellkern oder durch Beeinflussung der Translation erklären ließe. Da der Transport von β -Catenin nur durch dessen Interaktion mit den Kernporen reguliert wird[162], erschien die direkte Translationskontrolle sehr viel wahrscheinlicher. Um diese Frage weiter aufzuklären, wurde eine Immundetektion in verschiedenen Zellkompartimenten durchgeführt (Abb. 35).

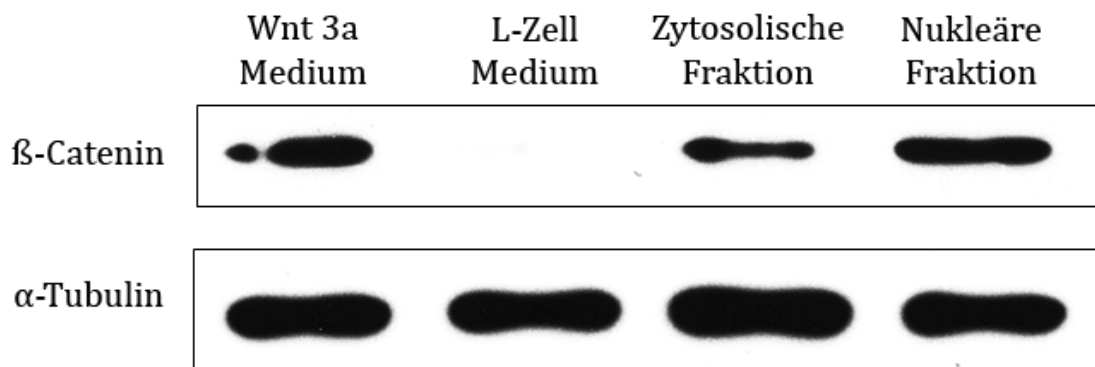


Abbildung 35: Western Blot von SR56 mit Extrakten aus HEK293-Zellen. Die zytosolische Zellfraktion und die Kernfraktion wurden vor der Inkubation der Zellen für den Western Blot 30 Minuten auf Eis mit SR56 inkubiert. Das Wnt3a-Medium und das L-Zell-Medium dienten als Kontrollen des Wnt-Signalwegs.

Für diesen Versuch wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt (siehe Kap. 4.3.2). Durch diese Fraktionierung erhielt man eine mit zytosolischen Proteinen angereicherte Fraktion und eine Fraktion, die hauptsächlich Zellkernproteine enthielt. Beide Fraktionen wurden für 30 Minuten bei 4 °C mit SR56 inkubiert und anschließend wurde dieses Protein-Inhibitor-Gemisch auf HEK293-Zellen

gegeben. Die Konzentration von SR56 wurde so gewählt, dass jeweils eine Endkonzentration von 4 μM vorlag. Wie in Abbildung 35 gezeigt, war in der zytosolischen Fraktion die nachgewiesene Menge an β -Catenin reduziert. In Gegenwart der Kernfraktion war SR56 inaktiv. Dies lässt vermuten, dass dort SR56 an ein Protein gebunden und damit inaktiviert wurde. Dieses Experiment weist darauf hin, dass das Zielprotein von SR56 im Zellkern zu suchen ist. Da bei der Zellfraktionierung auch die Kernmembran abgetrennt wurde, könnte die Transkriptionskontrolle durch den β -Catenin-TCF/Lef-Komplex das vermutete Ziel der Substanz sein. An diesem Komplex sind eine Vielzahl von Proteinen beteiligt. SR56 musste jedoch einen essentiellen Partner stören, da sonst die Aktivität des Reporter-Gen-Tests bei hohen Konzentrationen der Substanz nicht vollständig inhibiert werden würde.

Da Signalwege auf unterschiedlichsten Ebenen untereinander Informationen austauschen, ist die Modulation auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren ein ideales Ziel bei der Suche neuer aktiver Substanzen. Auf diese Art wird vermieden, Verbindungen zu generieren, die mehrere Signalwege gleichzeitig beeinflussen. Außerdem kann man bei dieser Art der Inhibition sicher sein, den Signalweg außerhalb von internen Rückkopplungsmechanismen zu stören und so einen direkten Effekt zu erzielen. Mit diesen vielversprechenden Ergebnissen wurde die Resynthese der Molekülstruktur von SR56 beschlossen. Im Zuge dieser Resynthese zeigte sich, dass die als SR56 in der Substanzdatenbank hinterlegte Verbindung nicht die angegebene Struktur besitzen kann, aber zu dieser ähnlich sein muss. Die Aufklärung der unbekanntenen Struktur der als SR56 hinterlegten Verbindung war bisher nicht erfolgreich. Gezielte Syntheseprojekte ergaben bisher keine Verbindung mit einem zu SR56 identischen NMR. Auch die biologische Aktivität konnte durch andere während dieses Projekts synthetisierte Substanzen nicht erreicht werden. Der Test der 320 Dekaline im Verlauf der Struktur-Wirkungsuntersuchungen (Abb. 32) zeigte aber, dass in dieser Substanzsammlung durchaus aktive, den Wnt-Signalweg inhibierende Verbindungen aufzufinden sind. Dr. Hongjan Sun setzt diese Arbeit daher fort und untersucht die Aktivität und das molekulare Ziel der Dekaline im Wnt-Signalweg.

5.3.5 Untersuchung von Aktivatoren des Wnt-Signalwegs

Neben den zahlreichen Inhibitoren wurden nur zehn Substanzen entdeckt, die die Aktivität des Wnt-Signalwegs in der Reporter-gen-Zelllinie mindestens verdoppeln konnten. Vier dieser zehn Verbindungen, darunter die beiden aktivsten des Sets, wiesen eine Oxepan-Substruktur auf. Um die Aktivität dieser Strukturklasse weiter zu prüfen, wurde eine 105 Mitglieder umfassende Bibliothek dieser Substanzen für Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht (Kap. 8.1). Die Verbindungen wurden in Konzentrationsreihen von 30, 20 und 10 μM getestet und auch mit den bei diesen Konzentrationen auftretenden Zytotoxizitäten korreliert (Tab. 8; Kap. 8.1). Eine Konzentration von 20 μM erschien für eine Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung geeignet, da bei 10 μM die Aktivität der Substanzen nicht stark genug war und bei 30 μM fast alle untersuchten Oxepanderivate den Signalweg aktivierten. Bei 20 μM aktivierten 50 der 105 Verbindungen den Signalweg um mindestens 50%. Abbildung 36 zeigt die aus den Messungen resultierende Struktur-Wirkungsbeziehung.

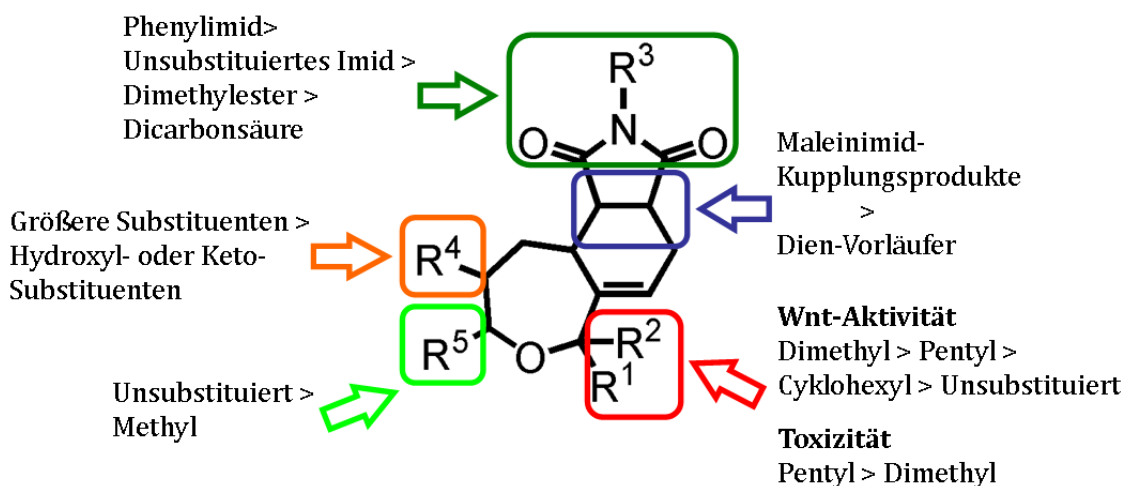


Abbildung 36: Struktur-Wirkungsbeziehungen der Oxepanbibliothek. An Position R^1 und R^2 sind Toxizitätsdaten angegeben, alle anderen Angaben beziehen sich auf die Wnt-Aktivität.

An Position R^1 und R^2 wurden große Substituenten nicht gut toleriert. Interessanterweise waren unsubstituierte Verbindung auch nicht sehr aktiv, sondern es erwiesen sich Methylgruppen an beiden Positionen als optimal. Die Positionen R^1 und R^2 waren zudem die einzigen, in denen ein klarer Trend für die Toxizität der Substanzen identifiziert werden konnte. Bei der untersuchten Konzentration waren insgesamt 14% der Substanzen toxisch. Die Stereochemie an der blau markierten Position konnte nicht für die Untersuchung herangezogen werden, da die Synthese an dieser Position nicht stereoselektiv erfolgte und eine

Trennung zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich war. Eine Vergrößerung des Ringsystems durch Anknüpfung eines Maleinimids verbesserte die Aktivität. Dieser Trend ließ sich auch an der Position R³ erkennen. Größere, unpolare Substituenten zeigten eine erhöhte Aktivität. Durch die Öffnung des Ringes entstanden Karbonsäuren mit geringer Aktivität, wohingegen die Methylester dieser Säuren wiederum aktiver waren, was auf einen negativen Einfluss polarer Gruppen an dieser Position hindeutet. Die größte Variabilität an Substituenten befand sich an Position R⁴, von Hydroxyl- oder Ketogruppen bis zu Acylketten mit 12 Kohlenstoff. Es wurden auch Ringsysteme wie Benzol, Naphtalin oder Piperazin durch verschiedene Linker an dieser Position angebunden. In den Aktivitäten dieser Strukturen war kein klarer Trend zu erkennen. Die sehr kleinen Hydroxyl- und Ketogruppen zeigten geringe Aktivität, wohingegen alle anderen Substituenten ähnlich aktiv waren. Insgesamt waren nur sechs Strukturen mit einer Methylgruppe an Position R⁵ in der Bibliothek, weshalb eine klare Einschätzung dieser Position nicht möglich war. Die Ergebnisse der Tests deuteten aber auf eine höhere Aktivität unsubstituierter Verbindungen hin. In Abbildung 29 wurde das Aktivitätsprofil der zwei stärksten Aktivatoren dargestellt. Die Verbindung CD290-1 wurde, beruhend auf den Struktur-Wirkungsbeziehungen, von Dr. C. Derave synthetisiert. Bei der synthetisierten Substanz CD290-1 handelt es sich, wie bei allen genutzten Oxepanen, um Gemische verschiedener Isomere und nicht um eine isomerenreine Substanz.

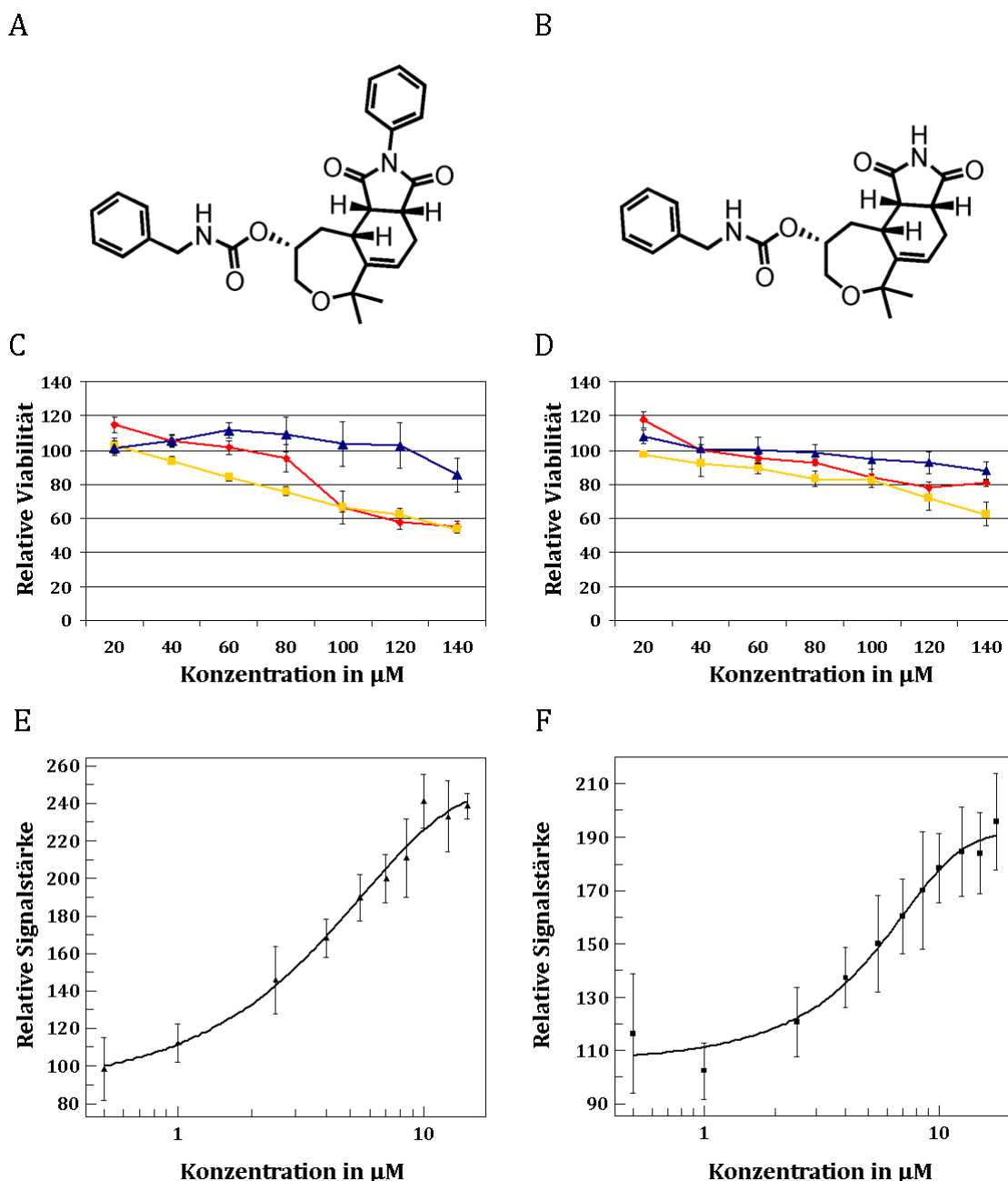


Abbildung 37: Darstellung der Aktivität der zwei stärksten Aktivatoren. A) Struktur von CD290-1. B) Struktur von SBO94. C) Toxizität der Verbindung CD290-1. D) Toxizität der Verbindung SBO94. C) und D) Blaue Darstellung HeLa-Zellen; Rote Darstellung HepG2-Zellen; Gelbe Darstellung HEK293-Zellen. E) Wnt-Signalwegaktivierung durch CD290-1. F) Wnt-Signalwegaktivierung durch SBO94.

Die höhere Aktivität der Substanz bestätigte die beobachteten Gesetzmäßigkeiten, da durch die Einführung des Phenolrings an Position R³ die Aktivität gegenüber SBO94 noch gesteigert werden konnte (Abb. 37E und F). Die Verbindungen waren in beiden Fällen in den für den Wnt-Signalweg genutzten Konzentrationsbereichen nicht toxisch. Die Toxizität war außerdem vom Zelltyp abhängig, wobei die Leberzelllinie HepG2 in ihrem Verhalten sehr ähnlich zu den

Hek293Zellen war. HeLaZellen erwiesen sich als etwas weniger empfindlich. Dieses Verhalten bestätigte sich auch bei Untersuchung der Oxepane SBO42 und SBO43 (Kap. 8.1), die aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zu SBO94 und CD290-1 und zur Verbesserung der Struktur-Wirkungsbeziehung ebenfalls bis zu einer Konzentration von 140 μM untersucht wurden. Da der Zytotoxizitätstest bei diesen Konzentrationen aber große Mengen an Substanz benötigt, wurde von einer Messung der ganzen Bibliothek in diesem Konzentrationsbereich abgesehen.

Verglichen mit der Untersuchung der Inhibitoren (Abb. 31) zeigten die Messungen der Oxepane sehr starke Schwankungen zwischen den Einzelwerten (Abb. 37E und F). Diese Streuung trat bei jeder gemessenen Konzentration auf. Es muss sich um eine für die Substanzklasse intrinsische Eigenschaft handeln und nicht um eine Ungenauigkeit des Tests, da andere Substanzklassen weniger streuende Ergebnisse lieferten. Trotz der Schwankungen der Messwerte waren die ED_{50} -Werte reproduzierbar. SBO94 (Abb. 37B) lieferte in fünf Messungen ED_{50} -Konzentrationen von 3,6, 3,9, 3,9, 4,4 und 5,5 μM und das obwohl die maximale Aktivität zwischen 126% und 192% der Kontrollen schwankte.

Nach der Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen konnte die Wirkungsweise der Substanzen genauer untersucht werden. Um eine Wirkung auf das Reporterenzym Luziferase auszuschließen, wurde ein *in vitro*-Test dieses Enzyms durchgeführt. Für diesen Test wurden vier aktive Substanzen untersucht und es konnte keine Beeinflussung des Enzyms durch die Substanzen festgestellt werden. Mit dem Enzym GSK-3 β wurden ebenfalls *in vitro*-Untersuchungen dieser vier aktiven Substanzen durchgeführt. Das Enzym GSK-3 β nimmt eine Schlüsselstellung bei der Regulation des Wnt-Signalwegs ein und ist das Ziel verschiedener, den Wnt-Signalweg aktivierender Substanzklassen.[163] Allerdings veränderte keine der hier untersuchten Substanzen die Enzymaktivität der humanen GSK-3 β *in vitro*.

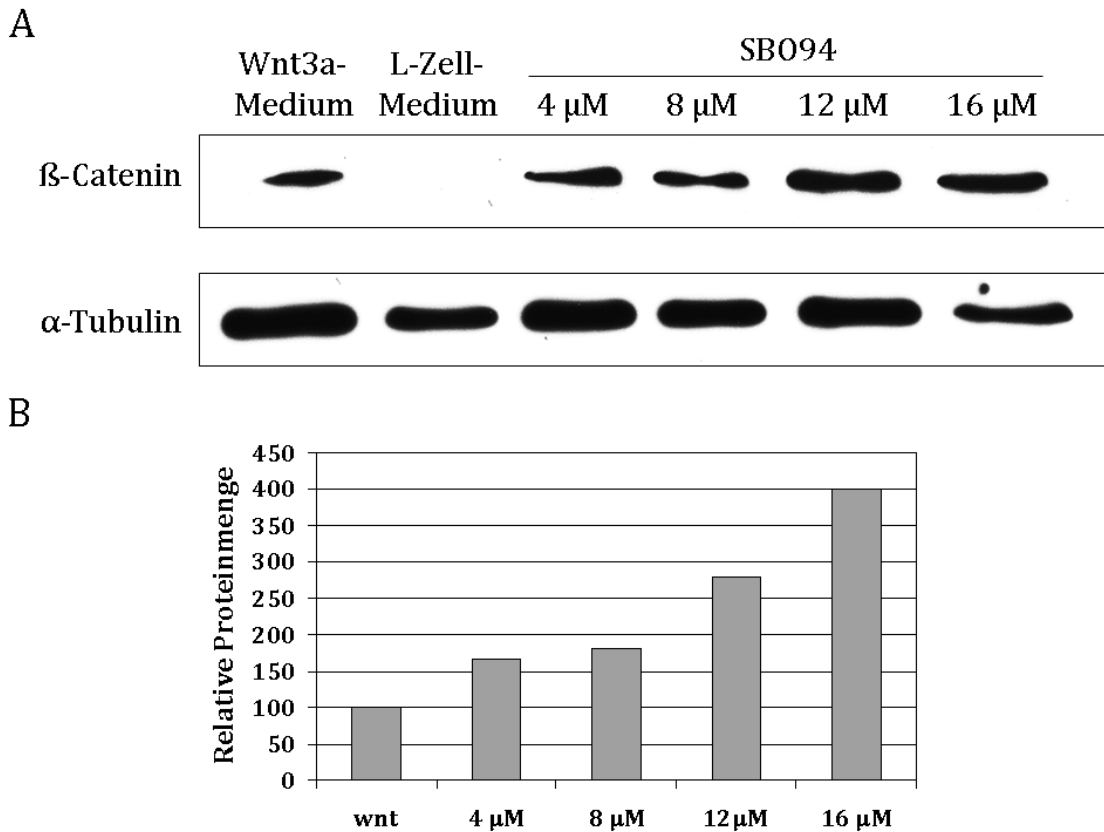


Abbildung 38: Western Blot von SBO94 in HEK293-Zellen. A) Western Blot von β -Catenin und Aktin in HEK293-Zellen. Aktin wurde als Ladungskontrolle genutzt. B) Densitometrische Auswertung des in Abb. 29 A dargestellten Western Blots. Die relative Proteinmenge ist in Prozent zur Wnt3a-aktivierten Kontrolle angegeben.

Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs ließ sich auch in nicht-transformierten HEK293-Zellen reproduzieren (Abb. 38). Dabei zeigte aber der konzentrationsabhängige Anstieg der β -Catenin-Menge nicht exakt dasselbe Verhalten wie die Reporter-gen-Zelllinie. Der Grad der Aktivierung schwankte allerdings in verschiedenen Wiederholungen gleicher Immunodetektionen stark, ähnlich wie es auch bei den Reporter-gen-Tests beobachtet wurde. Es ließ sich deshalb nicht abschließend klären, ob die Unterschiede in den verschiedenen Methoden tatsächlich signifikant waren.

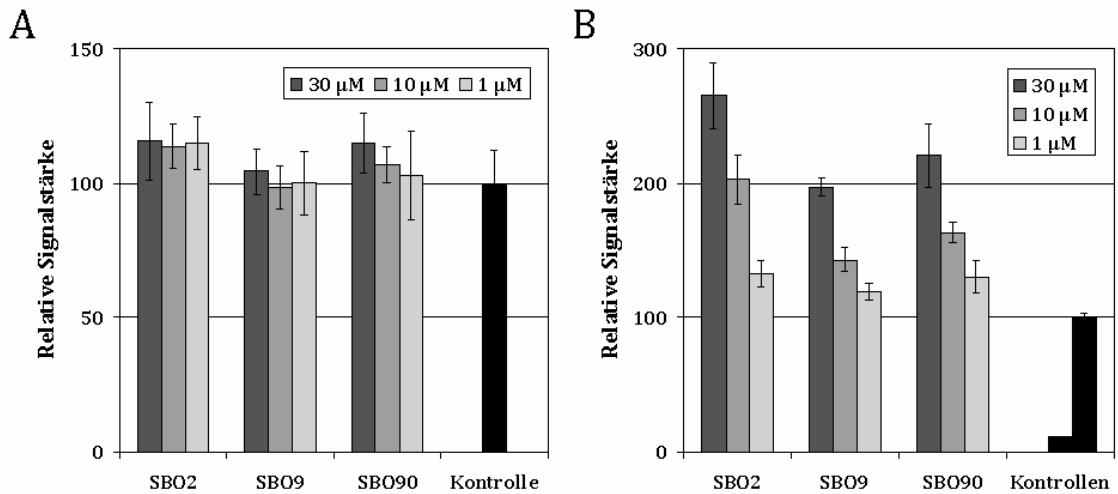


Abbildung 39: Synergistische Aktivität der Wnt-Signalweg-Aktivatoren. A) Aktivität der Substanzen SBO2, SBO9 und SBO90 ohne Stimulation der Zellen. Als Kontrolle diente das Wachstumsmedium. B) Aktivität der Substanzen SBO2, SBO9 und SBO90 nach Stimulation der Zellen mit 10% Wnt3a-haltigem Medium. Als Kontrollen wurde die Aktivierung durch 10% Wnt3a-Medium auf 100% gesetzt. Das entsprechend verdünnte L-Zell-Medium entsprach 10% dieser Aktivität.

Die Aktivität der Substanzen konnte nur beobachtet werden, wenn der Signalweg bereits aktiviert war (Abb. 39B). Im nicht-aktiven Zustand zeigten die Verbindungen keinen Effekt (Abb. 39A). Die Substanzen sind deshalb synergistische Signalwegsaktivatoren und keine reinen Aktivatoren im strengeren Sinne. Diese synergistische Wirkung konnte nicht erzielt werden, wenn der Signalweg durch Inhibition der GSK-3 β aktiviert wurde und auch in SW480-Zellen war dieser Effekt nicht zu beobachten. Da synergistische Effekte durch die Beeinflussung eines Signalwegs durch andere Signalwege auftreten können, sollte für weitere Untersuchungen eine Affinitätsreinigung genutzt werden. Bei dieser Methode werden Proteine identifiziert, die mit einer Verbindung interagieren (siehe Kap. 1.1). Durch diesen Ansatz konnten verschiedenste Signalwege und Interaktionspartner simultan ausgeschlossen oder identifiziert werden, da alle interagierenden Proteine gleichzeitig identifiziert werden können. Diese Fülle an Ergebnissen wäre durch einzelne Tests nicht möglich gewesen. Für die Affinitätsaufreinigung wurde von Dr. C. Derave ein Biotin mittels eines Linkers an ein Oxepan gebunden (Abb. 40A). Das Biotin ermöglichte aufgrund seiner hohen Affinität zu Streptavidin die Aufreinigung (siehe Kap. 4.3.7).

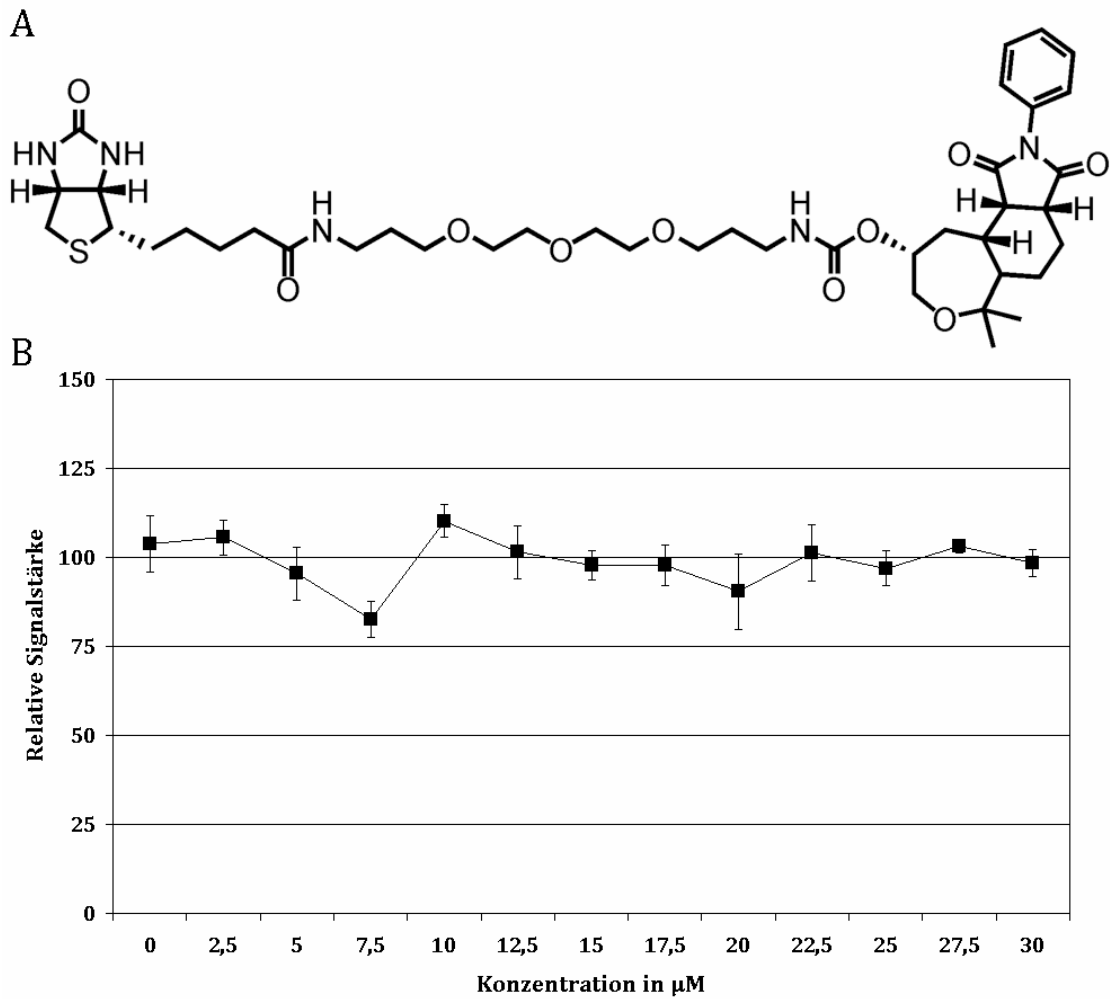


Abbildung 40: Struktur und Aktivität der Affinitätssonde. A) Struktur der Substanz CD267-3. B) Aktivität der der Substanz CD267-3.

Die Affinitätssonde erwies sich als inaktiv im Reporter-Gen-Test in Zellen. Auch in Western Blots konnte keine Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch diese Substanz festgestellt werden. Um zu unterscheiden, ob die Substanz ihre Aktivität verloren hatte oder ob sie noch aktiv, aber nicht mehr zellgängig war, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit der Substanz durchgeführt.

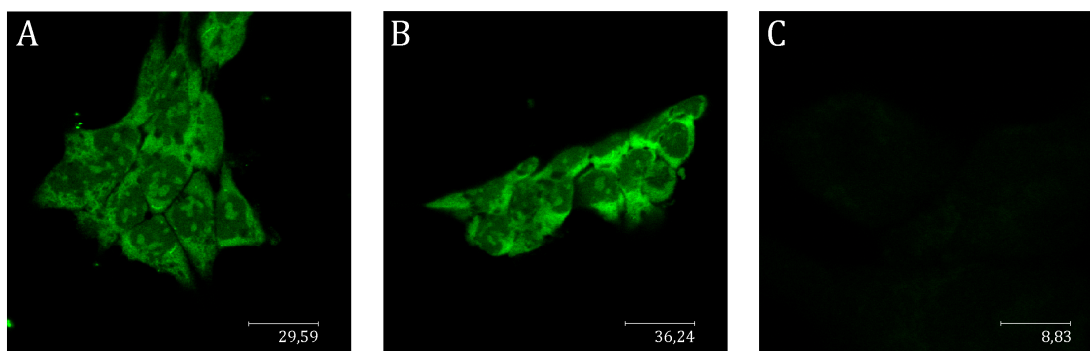


Abbildung 41: Immunfluoreszenzfärbung fixierter und permeabilisierter HEK293-Zellen mit der Affinitätssonde. A) und B) Färbung mit CD267-3. C) Kontrollfärbung mit Biotin-Kontrollmolekül. A-C) Für die Färbung wurden HEK293-Zellen und Streptavidin-Cy3 genutzt. Der Maßstab ist in μm angegeben.

Für diese Färbung wurden die Sonde und das Kontrollmolekül an ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidin gebunden und dieses Konjugat wurde anschließend für die Färbung eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Biotin mit Linkermolekül genutzt (Abb. 42B). Wie in Abbildung 41 gezeigt, war es möglich, eine spezifische Färbung zu erhalten. Die äußere Membran, das Zytoplasma und ein Nukleolus-ähnliches Kompartiment wurden stark angefärbt. Demgegenüber ist die Färbung des Kerns nur schwach ausgeprägt. Die unterschiedliche Anfärbung der Kompartimente spricht für eine differenzierte Affinität der Sonde. Es wurde daher vermutet, dass nur die Membrangängigkeit der Affinitätssonde vermindert war, weshalb mit der Affinitätsaufreinigung begonnen werden konnte.

Abbildung 42 zeigt die Struktur der Affinitätssonde und der Kontrolle. Leider war es nicht möglich, nur aufgrund der Struktur-Wirkungsbeziehungen ein inaktives und gleichzeitig ähnliches Molekül zu entwickeln. Die einzigen bei allen Konzentrationen inaktiven Substanzen waren Oxepane mit Carbonsäuren an Position R^3 . Dafür muss das Imid an Position R^3 (Abb. 36) hydrolysiert werden. Die dadurch erhaltene Dicarbonsäure wäre allerdings nicht nur um 91 g/mol leichter als die Ausgangsverbindung, sondern durch die beiden entstandenen deprotonierbaren Carbonsäuren in den Puffern der Affinitätsaufreinigung wahrscheinlich auch geladen. Diese Substanzen würden erheblich andere Wechselwirkungen mit Proteinen eingehen als die Ausgangssubstanz und deshalb diente als Kontrolle die Affinitätssonde ohne das Oxepan (Abb. 42B).

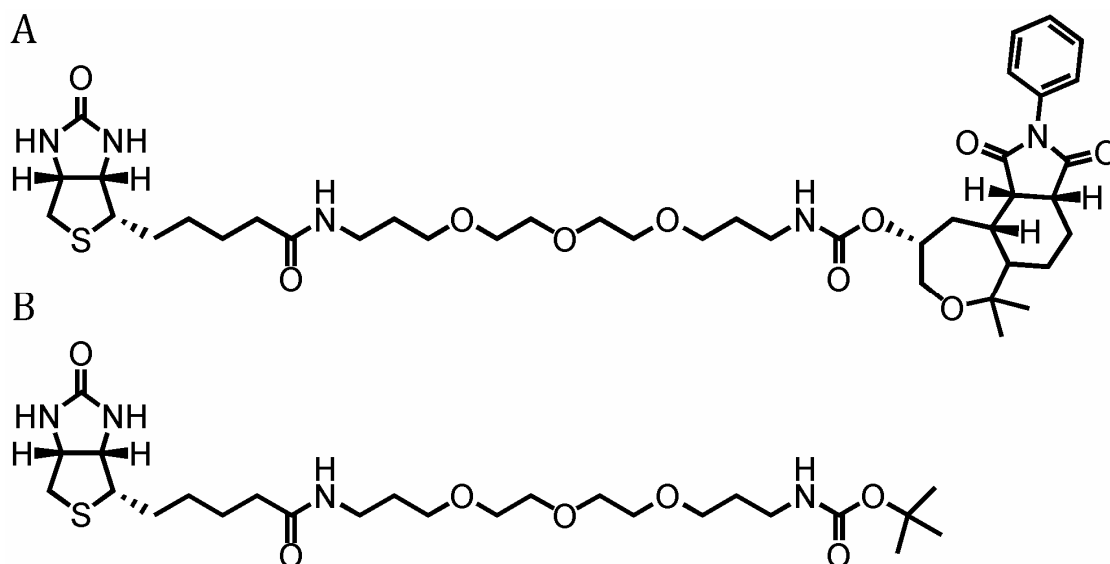


Abbildung 42: Strukturen der für die Affinitätsaufreinigung genutzten Moleküle. A) Chemische Struktur der Affinitätssonde CD267-3. B) Chemische Struktur des Kontrollmoleküls.

Das Prinzip der Affinitätsaufreinigung wurde in Kapitel 1.1 vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die komparative Methode genutzt, wobei ein entscheidender Schritt während der Affinitätsaufreinigung das Entfernen unspezifisch gebundener Proteine durch Waschen mit Pufferlösungen ist. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Waschpuffer enthielt unter anderem das chaotrope Salz MgCl_2 , welches wesentlich dazu beitrug, unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Bei einer Konzentration von 100 mM MgCl_2 wurden 33 Proteine identifiziert, von denen sechs (18%) nicht in der Kontrolle auftraten. Bei einer Konzentration von 75 mM MgCl_2 wurden 161 Proteine identifiziert, von denen 42 (26%) nicht in der Kontrolle auftraten, und bei 50 mM konnten 836 Proteine identifiziert werden, von denen 78 (9%) nicht in der Kontrolle auftraten. Eine Konzentration von 100 mM MgCl_2 wurde als Ausgangspunkt gewählt, da diese in dieser Abteilung bereits von Dr. D. Pendzialek[164] und Dr. T. Knoth[165] genutzt worden war. Für die hier genutzte Affinitätssonde erwies sich diese Bedingung allerdings als zu stringent. Das Optimum der Proteinanzahl und der Wahrscheinlichkeit, Proteine nur in der Affinitätsaufreinigung zu identifizieren, lag bei einer Konzentration von 75 mM MgCl_2 . Bei zu vielen Proteinen - wie im Fall einer 50 millimolaren Konzentration - kam es während der Analyse durch die HRMS (ESI) zu Überlagerungen in den Chromatogrammen. Die nach dem tryptischen Verdau erhaltenen Peptide konnten dann nicht mehr sauber aufgetrennt und einzeln analysiert werden. Es wurden mit diesen

optimierten Bedingungen fünf unabhängige Affinitätsaufreinigungen durchgeführt. Die Anzahl an identifizierten Proteinen erwies sich dabei als sehr ungenau, wobei das Verhältnis von identifizierten Proteinen in der Kontrolle und in der Aufreinigung nur wenig schwankte. Die Anzahl identifizierter Proteine war zudem stark von der genutzten Datenbank abhängig. Bei zwei Aufreinigungen wurden deutlich mehr Proteine identifiziert als nach den initialen Messungen, die zur Optimierung der Waschbedingungen durchgeführt wurden, zu vermuten gewesen war. In beiden Fällen wurden bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,1% ungefähr 1000 Proteine identifiziert, von denen 220 bzw. 280 nicht in der Kontrolle auftraten. Diese Proteinmengen entsprachen ungefähr dem Fünffachen der anderen Messungen, welche im Schnitt 200 Proteine identifizierten, von denen ungefähr 50 bei der gleichen Fehlerwahrscheinlichkeit nicht in der Kontrolle auftraten. Dieser Unterschied in der Detektionshäufigkeit konnte nicht endgültig geklärt werden, aber es wurde ein Zusammenspiel der massenspektrometrischen Messbedingungen mit der Probenvorbereitung vermutet. Die Trefferrate, Proteine nur in der Affinitätsaufreinigung zu identifizieren, lag bei allen Messungen im Bereich von 25% und damit in dem durch die Vorversuche als optimal ermittelten Bereich. Aus diesem Grund wurde auch keine der Analysen verworfen.

Bei der Analyse der Peptidfragmente durch das Computerprogramm Mascot ist die Genauigkeit der Peptididentifizierung anzugeben. Im vorliegenden Fall wurden dazu zwei Bedingungen genutzt. Bei einer Wahrscheinlichkeit von 0,1% war die Suche sehr genau, während bei 1% stärkere Abweichungen zwischen einem idealen und dem tatsächlich gemessenen Peptidfragmentmuster erlaubt waren. Die Auswertung der erhaltenen Peptide erfolgte durch eine Suche in der SwissProt-Datenbank (Version 57.13).

In Tabelle 4 sind alle Proteine aufgeführt, welche in wenigstens drei der fünf Aufreinigungen identifiziert wurden. Identifiziert bedeutet in diesem Zusammenhang eine Identifikation des Proteins in der Aufreinigung mit der Affinitätssonde und ein Fehlen des Proteins in der dazu gehörigen Kontrolle.

Tabelle 4: Identifizierte Proteine durch die SwissProt Datenbank ohne Einschränkung der Organismen. Die Proteinnamen und Funktionen wurden aus der Swiss-Prot Datenbank (Version 57.14) extrahiert.

Abkürzung	voller Name	Funktion	Fehlerwahrscheinlichkeit
Drs7b	Dehydrogenase / reductase SDR family member 7b	Vorhergesagte Dehydrogenase mit breitem Substratspektrum	0,1% und 1%
Cdc2	Cell Division control protein 2 homolog	Kontrolle des Zellzyklus zwischen G1- und S-Phase	0,1% und 1%
Rif1	Telomere-associated protein RIF1	Unterbrechung des Zellzyklus bei DNA-Schäden	0,1% und 1%
Tfr1	Transferrin receptor protein 1	Rezeptor für die Aufnahme von Eisen	0,1% und 1%
Vang1	Vang-like protein 1	Rezeptor des Wnt-Signalwegs	0,1%
Phb2	Prohibitin-2	Repressor des Estrogen-Signalwegs	0,1%
Mipep	Mitochondrial intermediate peptidase	Prozessierung mitochondrialer Proteine	1%
Pesc1	Pescadillo homolog 1	rRNA-Reifung; Ribosomen-Biogenese, moduliert Translation	1%
Ssrd	Translocon-associated protein subunit delta	Integrales Membranprotein des ER, reguliert die Kalziumhomöostase der Zelle	1%

Nur das Protein Cdc2 wurde in vier von fünf Messungen identifiziert. Alle anderen Proteine traten in drei der fünf Versuche auf. Bei einer Wahrscheinlichkeit von 0,1% wurden sechs Proteine gefunden und bei 1% waren es sieben. Vier Proteine wurden in beiden Suchen identifiziert. Es wäre eigentlich zu erwarten, dass alle Proteine, die bei hoher Stringenz (0,1%) identifiziert wurden, auch bei geringerer Genauigkeit (1%) zu finden wären. Tatsächlich trat dann aber oft das Protein

auch in den Kontrollen auf. Die drei Proteine, welche nur bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% identifiziert wurden, waren alle wahrscheinlich nur gering exprimiert. Es wäre möglich, dass sie deshalb bei strengeren Suchkriterien nicht gefunden wurden.

In der Proteinliste fallen vier Proteine auf. Zum einen Cdc2, welches als einziges Protein in vier von fünf Experimenten identifiziert wurde, und zum anderen Vang1, Phb2 und Pesc1, welche alle eine Rolle in Signalwegen spielen. Vang1 und auch Pesc1 haben Funktionen bzw. Phänotypen, die mit dem Wnt-Signalweg in Verbindung gebracht werden können (siehe Kap. 1.2.4 und 6.3 für Vang1 und Kap. 6.3 für Pesc1). Aus diesem Grund wurden Cdc2, Vang1 und Pesc1 genauer untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse werden am Ende des Kapitels genauer besprochen. Zuerst wurde noch eine andere Art der Auswertung durchgeführt, welche im Folgenden vorgestellt werden soll. Die durch die HRMS (ESI) identifizierten Peptidfragmente wurden auch in einer auf humane Proteine beschränkten SwissProt-Datenbank gesucht. Die gesamte SwissProt-Datenbank und die humanisierte Datenbank enthalten eine sehr unterschiedliche Anzahl an Proteinen, weshalb die Suchalgorithmen auch unterschiedliche Ergebnisse lieferten.

Nur die Proteine Drs7B und SsrD wurden durch beide Suchen identifiziert. Dies bedeutete allerdings nicht, dass bei der Suche in der alle Organismen enthaltenden Datenbank nur nichtmenschliche Proteine identifiziert wurden, sondern die in Tab. 4 angegebenen Proteine waren entweder auch humanen Ursprungs oder die Peptidfragmente hätten auch dem humanen Protein zugeordnet werden können. Die vollständigen Ergebnisse der Datenbankabfrage der humanen Datenbank sind aufgrund des Umfangs im Anhang 8.2 dargestellt. Es wurden elf Proteine mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,1% und 42 Proteine bei 1% gefunden, wobei fünf Proteine in beiden Listen auftraten.

Nur eines der identifizierten Proteine aus der humanen Datenbank, humanes Vang2, stand in direktem Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg. Die Aminosäuresequenz dieses Proteins ist zu 72% identisch mit der Sequenz von humanem Vang1. Die weiteren Experimente konzentrierten sich deshalb auf die oben beschriebenen Proteine Cdc2, Vang1 und Pesc1.

Um die Ergebnisse der Affinitätsaufreinigungen zu überprüfen, wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt.

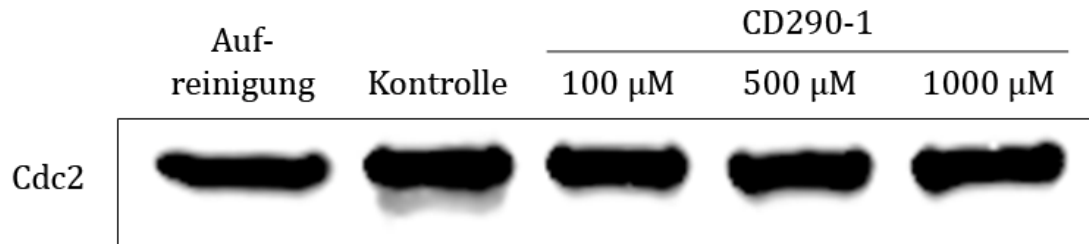


Abbildung 43: Western Blot gegen Cdc2 nach Affinitätsaufreinigung. Mittels Western Blot wurde die Proteinmenge detektiert, die an der Affinitätsmatrix nach der Aufreinigung gebunden war. Die Aufreinigung erfolgte mit CD267-3 (Abb. 42A). Als Kontrolle diente das Biotin-Kontrollmolekül (Abb. 42B). CD290-1 wurde in verschiedenen Konzentrationen genutzt, um mit der Affinitätssonde zu konkurrieren.

Abbildung 43 zeigt den Nachweis von Cdc2 nach der Affinitätsaufreinigung. Das Protein band ähnlich stark an die aktive Substanz wie an das Kontrollmolekül. Durch Zugabe von CD290-1 in verschiedenen Konzentrationen wurde versucht, gebundenes Cdc2 nach der Affinitätsaufreinigung wieder von der Affinitätsmatrix zu verdrängen. Dies gelang jedoch nicht, was ein Indiz für eine unspezifische oder sehr feste Bindung war. Gegen die feste Bindung spricht die starke Bindung der Proteine an das Kontrollmolekül und bei einer spezifischen Bindungsstelle wäre eine Verdrängung zu erwarten gewesen.

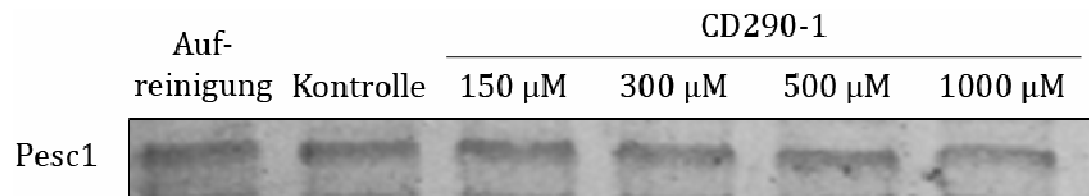


Abbildung 44: Western Blot gegen Pesc1 nach Affinitätsaufreinigung. Mittels Western Blot wurde die Proteinmenge detektiert, die an der Affinitätsmatrix nach der Aufreinigung gebunden war. Die Aufreinigung erfolgte mit CD267-3 (Abb. 42A). Als Kontrolle diente das Biotin Kontrollmolekül (Abb. 42B). CD290-1 wurde in verschiedenen Konzentrationen genutzt, um mit der Affinitätssonde zu konkurrieren.

Auch im Falle von Pesc1 konnte keine spezifische Bindung nachgewiesen werden (Abb. 44). Das Protein bindet, wie auch Cdc2, mit ähnlicher Stärke an die Affinitätssonde und an das Kontrollmolekül. Ungebundenes CD290-1 kann auch in sehr hohen Konzentrationen nicht die Bindungsstellen der Affinitätssonde am Protein besetzen, was auf eine unspezifische Wechselwirkung hindeutet.

Die ähnlich starken Bindungen von Cdc2 und Pesc1 zur aktiven Probe und zur Kontrolle waren verwunderlich, bedenkt man, dass beide Proteine nach der Affinitätsaufreinigung nicht in den Kontrollen identifiziert wurden. Die Sensitivitätsgrenze des Nachweises von Proteinen durch die institutseigene

Nano-LC-MS/MS liegt im Bereich von 100 bis 500 fmol Protein im Gel (pers. Mitteilung von Dr. P. Janning). Die Western Blots nach den Affinitätsaufreinigungen wurden mit dem System der Firma LI-COR gemacht, welches eine Nachweisgrenze von ungefähr einem Picogramm besitzt. Bei einem 50 kDa schweren Protein entspricht das ungefähr 20 fmol. Da die Banden im Western Blot relativ ähnliche Intensitäten haben, konnte die unterschiedliche Empfindlichkeit nur einen ersten Anhaltspunkt für die unterschiedlichen Nachweise liefern. Möglicherweise überlagerten sich auch Peptidfragmente in der Nano-LC-MS/MS, was zu Problemen bei der Identifikation der Peptidionen führen konnte. Eine gleichartigere Kontrolle hätte dieses Problem wahrscheinlich reduzieren können. Solch eine Kontrolle würde verglichen mit CD267-3 generell mit ähnlicherer Affinität an unspezifische Proteine binden und damit ebenfalls ähnlichere Chromatogramme erzeugen, was zu einer Reduzierung der Varianz zwischen Kontrollmessung und der Messung mit der Affinitätssonde führen würde. Dieser Nachteil der Aufreinigung war auch für Vang1 erkennbar (Abb. 45). Allerdings konnte das Protein Vang1 in diesem Fall durch CD290-1 von der Affinitätsmatrix verdrängt werden.

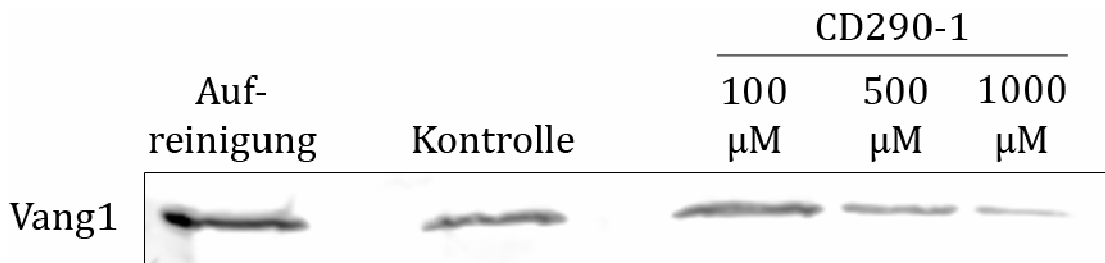


Abbildung 45: Western Blot gegen VANG1 nach Affinitätsaufreinigung. Die Aufreinigung erfolgte mit CD267-3 (Abb. 42A). Als Kontrolle diente das Biotin-Kontrollmolekül (Abb. 42B). CD290-1 wurde in verschiedenen Konzentrationen genutzt, um mit der Affinitätssonde zu konkurrieren.

Die für diese Verdrängung benötigten hohen Konzentrationen deuteten auf eine relativ hohe Affinität zwischen dem Protein und der Substanz oder auf eine Maskierung durch andere Bindepartner hin. Dennoch ließ sich eine genau definierte und kompetierbare Wechselwirkung beobachten. Mit Vang1 wurde durch die Affinitätsaufreinigung ein Protein identifiziert, dessen Rolle im Wnt-Signalweg eine mögliche Erklärung für den beobachteten synergistischen Effekt liefern konnte. Da es sich bei Vang1 um ein integrales Membranprotein handelt sind *in vitro*-Messungen der Affinität und der Bindekonstanten aber nicht einfach

durchzuführen. Weitere Untersuchungen durch eine auf Bakteriophagen beruhenden Proteindatenbank werden von Tyen Tran durchgeführt.

5.4 Weitere wissenschaftliche Projekte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einer Reihe unterschiedlicher Kooperationen Fragestellungen aus verschiedenen Gebieten der chemischen Biologie untersucht. Die Projekte, die zu Publikationen in anerkannten Fachzeitschriften beitrugen, sollen im Folgenden kurz erläutert werden

5.4.1 Immobilisierung lebender Zellen auf Oberflächen

Die kontinuierliche Miniaturisierung von Arbeitsplattformen und gleichzeitig die konstante Erhöhung von Datenmengen, die aus einzelnen Versuchen gewonnen werden sollten, führte in den letzten Jahrzehnten zur Entwicklung von Mikroarrays.[166] Heutzutage werden diese Plattformen in den verschiedensten biologischen Bereichen genutzt. Die Anwendungen dieser Technologie reichen von Nukleinsäuren[166] und Proteinbasierten Fragestellungen[167] über niedermolekulare Verbindungen[168] bis zu komplexen Krankheitsbildern[169]. Der Grad an Miniaturisierung, der mit dieser Technik erreicht werden kann, ist zum Teil ganz erheblich. Im Vergleich mit einem in einer Mikrotiterplatte durchgeführten ELISA Test kann man bei der Verwendung eines Mikroarrays mit einem Millionstel des benötigten Proteins 10.000 Datenpunkte anstelle von einem einzigen messen.[170,171]

Die Arbeitsgruppe von Prof. Niemeyer an der Technischen Universität Dortmund hat besondere Erfahrung auf dem Gebiet der Herstellung von Mikroarrays durch DNA-vermittelte Immobilisation (DDI).[172] Das Ziel der Kooperation war die Erzeugung von Mikroarrays lebender Zellen durch diese Technologie. Für die Immobilisierung der Zellen wurde die Bindung zellulärer Integrine an ihre Arg-Gly-Asp (RGD) Erkennungssequenz genutzt.[173] Dieses Verfahren war für die Erzeugung von Mikrostrukturen bereits gut untersucht.[174,175] Neben linearen RGD-Peptiden wurden auch zyklische RGD-Peptide getestet, welche für eine stärkere Bindung der Integrine sorgten.[175]

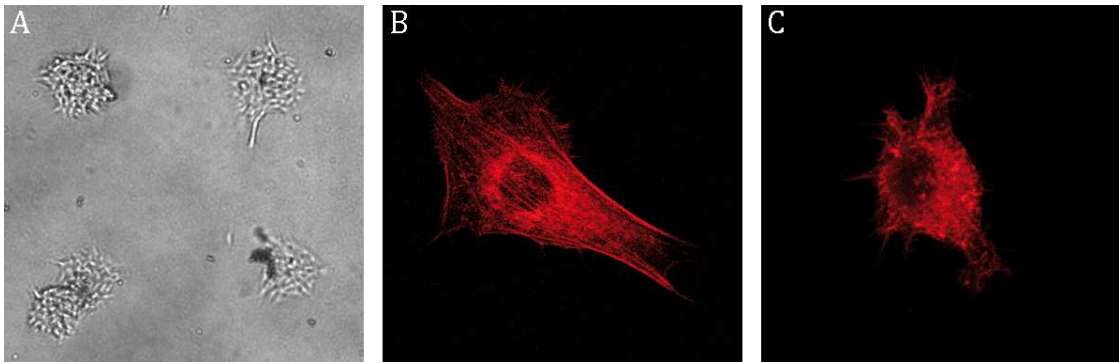


Abbildung 46: Repräsentative Ergebnisse der Zellimmobilisation auf Silizium-Oberflächen durch DNA-vermittelte Immobilisation von Integrin bindenden Peptidmotiven. A) Durch 3T3-Zellen bewachsene Mikrostrukturen. B) Anfärbung des Aktins einer 3T3-Zelle auf einer Mikrostruktur mit RGD-Peptid. C) Immunfluoreszenz des Aktins einer 3T3-Zelle auf einer Mikrostruktur mit einem aus fünf Glyzinen bestehenden Peptid. B) – C) Die Anfärbung erfolgte durch TRITC-Phalloidin

Wie in Abbildung 46A gezeigt, wurden durch DDI-Technologie erzeugte Mikrostrukturen effektiv von Zellen besiedelt. Es war allerdings notwendig, dass die Oberflächennukleotidsequenzen durch Inkubation mit komplementären DNA-Peptidkonjugaten zuvor passiviert wurden, da die Zellen eine sehr hohe intrinsische Affinität zu DNA-Mikrostrukturen besaßen. Zellen, die auf der RGD-Integrin-Erkennungssequenz wuchsen, zeigten ein normales Zytoskelett (Abb. 46B), während Zellen auf Glycin-tragenden Mikrostrukturen deutlich verändert waren (Abb. 46C). Die abgerundete Morphologie dieser Zellen kommt zustande, da die Integrine, welche normalerweise als Verankerungspunkte des Zytoskeletts dienen, nicht effektiv an die Oberfläche binden können.[176] Diese Arbeit zeigte die Einsetzbarkeit der DDI Technologie zur Erzeugung von Mikrostrukturen mit lebenden Zellen. Somit wurden weitere Arbeiten ermöglicht, die die besonderen Eigenschaften dieser Oberfläche nutzten, wie zum Beispiel das Austauschen von DNA-Oligomeren durch Konkurrenz.

5.4.2 Untersuchung von Thiopeptid-Antibiotika

Mit dem Naturstoff Micrococcin wurde 1948 das erste Thiopeptidantibiotikum isoliert.[177] Diese aus α -Aminosäuren aufgebauten Antibiotika blockieren die Proteinbiosynthese grampositiver Bakterien[178]. In der Arbeitsgruppe von Dr. Arndt in der Abteilung Chemische Biologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie beschäftigt man sich durch Total- und Semisynthese mit

Thiostrepton und Nosiheptid, zwei potenten Thiopeptidantibiotika. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die semisynthetisch hergestellten Derivate des Thiostreptons untersucht. Es wurden hierfür MIC-Werte nach der in Kapitel 3.2 beschriebenen Methode bestimmt.[179,180].

Neben der Suche nach potenteren oder pharmakologisch optimierten Thiostreptonderivaten beschäftigt sich die Arbeitsgruppe von Dr. Arndt auch mit der Wirkungsweise dieses Antibiotikums. Zwar sind Kristall- und NMR-Struktur ohne[181-183] und mit gebundenem Thiostrepton vorhanden[184-186], doch sind damit noch nicht alle Fragen zu der Wechselwirkung von Thiostrepton und den ribosomalen Protein- bzw. Nukleinsäurepartnern geklärt. Um den Mechanismus weiter aufzuklären, wurde von S. Schoof eine fluoreszente Thiostrepton-Sonde synthetisiert. Neben biochemischen Untersuchungen, welche von S. Baumann durchgeführt wurden, wurde die Sonde auch für mikroskopische Aufnahmen genutzt.

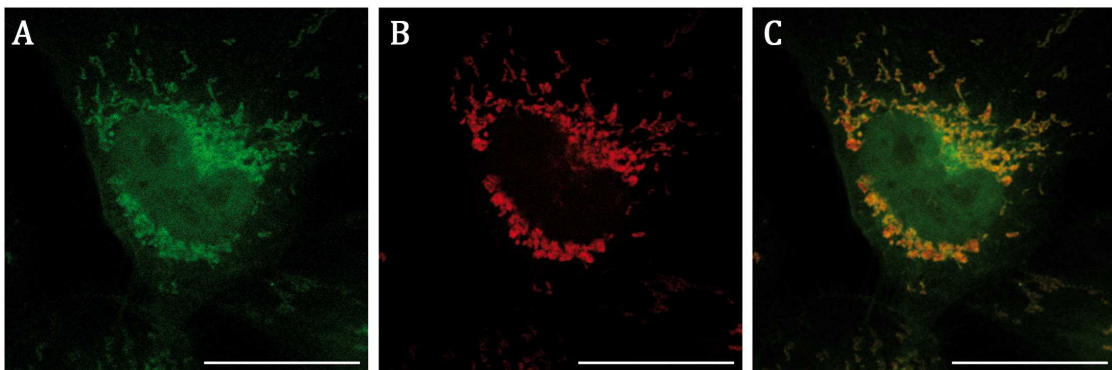


Abbildung 47: Immunfluoreszenzaufnahmen von BSC-1-Zellen zur Lokalisation der Thiostrepton-bindenden Proteine. A) Thiostrepton-Sonde in Grün. B) Durch MitoTracker gefärbte Mitochondrien in rot. C) Überlagerung der Farbkanäle aus A) und B). Der Maßstab entspricht 10 μm .

Wie in Abbildung 47 gezeigt, färbt die Sonde die Mitochondrien, ein kernnahes Kompartiment und zu einem geringeren Teil auch den Kern selbst an. Die deutliche Färbung der Mitochondrien wurde bereits zuvor vermutet, da das mitochondriale Ribosom eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum bakteriellen Ribosom, der Wirkungsstätte des Antibiotikums, besitzt. Die Färbung des Kerns könnte durch die Wechselwirkung von Thiostrepton mit dem Transkriptionsfaktor FoxM1 oder des 20S Proteasoms erklärt werden.[187] Bei dem kernnahen Kompartiment wurde vermutet, dass es sich um den Golgi Apparat handelt. Dort befindet sich zwar kein bekanntes Zielprotein, aber möglicherweise wurde Thiostrepton von einem neu synthetisierten Protein

gebunden. Das Genom des Mitochondriums kodiert nur für 13 Proteine[188], alle anderen müssen in das Mitochondrium transportiert werden, wobei der Golgi Apparat möglicherweise eine Rolle spielt.

5.4.3 Untersuchung einer Bibliothek Chondramid- und Jaspamid-ähnlicher Verbindungen

Die Chondramide und Jaspamide sind zueinander ähnliche, aktinfasern stabilisierende Naturstoffe.[189,190] Insgesamt wurden bisher 15 Mitglieder der Familie der Jaspamide[191] und vier Mitglieder der Familie der Chondramide[192] aus natürlichen Quellen isoliert. In der Abteilung von Prof. Waldmann wurde im Rahmen von Untersuchungen zur Strukturaufklärung und Aktivitätssteigerung eine Kollektion von Chondramid- und Jaspamid-ähnlichen Verbindungen hergestellt. Die Klassen der Jaspamide wurden im Rahmen ihrer Isolation auf ihre wachstumshemmenden Eigenschaften gegen zwei Krebszelllinien, MCF-7 und HT-29, getestet.[191,193] Es war deshalb sinnvoll, einen Test der neu synthetisierten Substanzen in denselben Zelllinien durchzuführen, damit deren Zytotoxizitätsprofile mit den Naturstoffen verglichen werden konnten. Die Ergebnisse der insgesamt 25 Substanzen sind im Anhang 8.3 dargestellt und wurden genutzt, um eine Struktur-Wirkungsbeziehung aufzustellen, welche die Publikation der Synthese unterstützen konnte.[194] Parallel zu den Zytotoxizitätsstudien wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, um diese beiden biologischen Effekte miteinander zu korrelieren (Abb. 48).

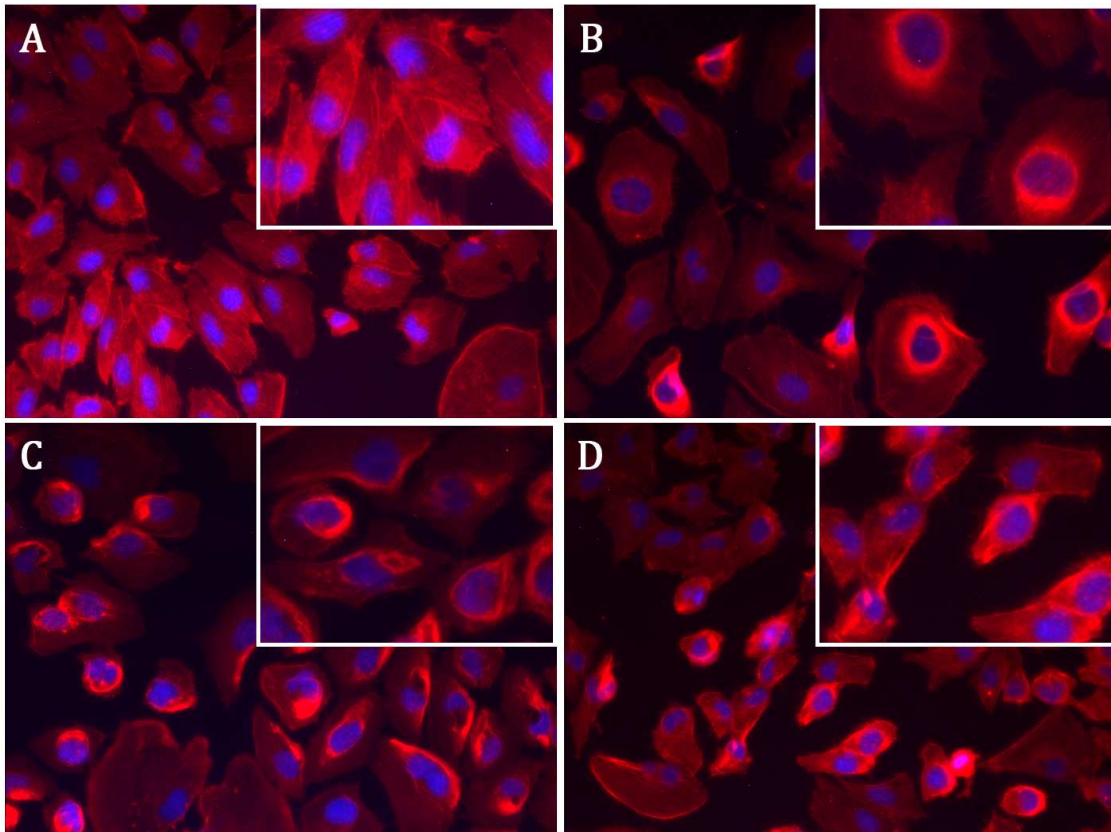


Abbildung 48: Immunfluoreszenzaufnahmen des Aktin-Zytoskeletts von BSC-1-Zellen nach Substanzbehandlung. A) Nach DMSO-Behandlung. B) Nach Behandlung mit 25 nM Jaspamide. C) Nach Behandlung mit 100 nM Hu2-97. D) Nach Behandlung mit 50 nM LGM163. A) - D) Alle Zellen wurden 24 Stunden nach Substanzzugabe mit TRITC-Phalloidin gefärbt. Der Kasten oben rechts in den Bildern zeigt einen vergrößerten Bildausschnitt.

Das gut organisierte Zytoskelett mit den charakteristischen Stressfasern (Abb. 48A) wurde durch die Zugabe verschiedener Jaspamidanaloga zerstört (Abb. 48B-D). Es traten in diesen Zellen Aktinhäufungen im Bereich des Zellkerns auf. Die Substanzkonzentrationen entsprachen jeweils den IC_{50} -Werten der Zytotoxizitätsmessungen. Die Gleichartigkeit der Aufnahmen (Abb. 48B-D) und die Vollständigkeit des Effekts zeigen die gute Übereinstimmung der Zytotoxizitätsdaten mit den mikroskopischen Aufnahmen.

5.4.4 Klonierung einer Fluoreszenzsonde zur Untersuchung der intrazellulären Proteinverteilung

Das N-Ras-Protein spielt eine wichtige Rolle im Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg. Um Signale weiterzuleiten, muss das Protein an der Membran aktiviert werden. Damit es stabil an die Membran binden kann benötigt es zwei Lipidanker, die sich am C-Terminus befinden. Die irreversible Farnesylierung an Cystein 186 und die zusätzliche reversible Palmitoylierung von Cystein 181 verankern N-Ras an der Membran.[195,196] Durch die Depalmitoylierung des Proteins, an der mindestens eine membranassoziierte Esterase beteiligt ist, verliert es diese stabile Verankerung und verteilt sich über die intrazellulären Endomembranen.[197] Am Golgi Apparat kann dann die Repalmitoylierung des Ras-Proteins und der erneute Transport zur Membran stattfinden.[195]

Im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. P. Bastiaens und Prof. Dr. H. Waldmann wurde die Spezifität dieses Zyklus genauer analysiert. Vorangegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass die Palmitoylierung des N-Ras-C-Terminus nicht stereospezifisch erfolgt.[198] Um zu klären, ob der De- und Repalmitoylierungsprozess von einem Motiv im Ras-Protein selbst abhängt, musste ein künstliches, palmitoylierbares Protein erzeugt werden. Durch MIC-Ligation sollte ein N-Ras-C-Terminus an ein normalerweise nicht membranassoziiertes Protein fusioniert werden.[199] Die MIC-Ligation nutzt dazu ein freies Cystein am Protein. Versuche, ein internes Cystein von EGFP für eine MIC-Ligation zu verwenden, schlugen fehl. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein EGFP-Protein so verändert, dass es ein C-terminales freies Cystein trug. Dafür wurde eine EGFP-kodierende Sequenz, durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR), mit einer zusätzlichen N-terminalen TEV-Protease-Erkennungssequenz und einem zusätzlichen Kodon für ein C-terminales Cystein amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den Expressionsvektor pET-44a(+) kloniert.

Der auf diese Weise erzeugte Vektor codiert ein EGFP, welches am N-Terminus zwei Motive aus sechs Histidinen trägt. Diese Motive ermöglichen die Aufreinigung des Proteins, und die ebenfalls angehängte TEV-Protease-Erkennungssequenz erlaubt das nachträgliche Entfernen beider Motive. C. Novak exprimierte das EGFP, welches N-Terminal ein zusätzliches Glycin, als Ergebnis

der TEV-Spaltung, und C-Terminal ein zusätzliches Cystein trug. Es gelang ihr, dieses Protein mittels einer MIC-Ligation mit einem N-Ras-C-Terminus zu verknüpfen. Weitere Analysen, durchgeführt von Dr. O. Rocks, konnten zeigen, dass dieses EGFP-Protein ebenfalls in den für N-Ras beschriebenen Zyklus eintritt.[200]

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Klonierung wurde ein Modellsubstrat erzeugt, um den De- und Repalmitoylierungsprozess zu untersuchen. Damit konnte gezeigt werden, dass dieser Kreislauf mit geringer Substratspezifität die Verteilung peripherer Membranproteine reguliert.

6. Diskussion

6.1 Beurteilung der repräsentativen Substanzauswahl

Gegenüber der in dieser Arbeit erstellten Substanzauswahl bestand der Anspruch, dass sie in möglichst vielen verschiedenen zellulären Tests eingesetzt werden kann. Deshalb konnte keines der in Kapitel 1.1 beschriebenen Modelle direkt zur Erstellung der Substanzauswahl genutzt werden. Zum einen sollten mit der Auswahl unbekannte zelluläre Zielproteine identifiziert werden, was chemoinformatische und physikochemische Methoden ausschloss, da diese einen Startpunkt für eine Auswahl und Optimierung benötigen. Zum anderen waren keine physiologischen Daten gemäß ADMET verfügbar, auf denen pharmazeutische Modelle beruhen. Auch die von Lipinski et al. aufgestellten Regeln waren nicht geeignet, beruhen sie doch auf vermarkteten Medikamenten, deren Eigenschaften sich zum Teil deutlich von aktiven Substanzen in frühen Phasen der Wirkstofffindung unterscheiden. Zudem wurde die Wirkstoffklasse der Antibiotika in diesen Regeln ganz explizit ausschlossen, da Antibiotika eine geringere Löslichkeit als andere Medikamente besitzen.[9] Es wurde berechnet, dass Substanzen gegen gramnegative Bakterien idealerweise einen mittleren ClogP-Wert von vier haben sollten und solche gegen grampositive sogar einen mittleren ClogP-Wert von sechs.[2] In diesen Bereichen würden die höchsten zellulären Konzentrationen erreicht werden.

Es wurden deshalb nur Substanzen aus der Auswahl entfernt, die einen AlogP-Wert von mehr als sechs besaßen. Mit der Anforderung, dass eine Substanz wenigstens einen Ring oder ein stereogenes Zentrum oder drei Heteroatome besitzen sollte, wurden chemische Parameter genutzt, um biologisch relevante Substanzen beizubehalten. Die beiden genutzten chemischen Filter reduzierten die Substanzauswahl nur geringfügig. Die Auswahl wurde anschließend in Gruppen mit ähnlichen Verbindungen zusammengefasst. Um einen reproduzierbaren Datensatz zu erhalten, wurde ein computergestützter Algorithmus genutzt, da bei großen Datensätzen eine manuelle Auswahl nicht konsistent und reproduzierbar ist.[201] Bei kleineren Datensätzen ist eine manuelle Analyse aber durchaus sinnvoll, weshalb die einzelnen von der Software

generierten Gruppen strukturell ähnlicher Substanzen noch einmal von drei Chemikern der Abteilung analysiert wurden (Tab. 5).

Tabelle 5: Beanstandete Gruppen nach der automatischen Einteilung. Die Übereinstimmung der Chemiker untereinander ist durch die Schnittmengen gezeigt.

	Chemiker 1	Chemiker 2	Chemiker 3
Chemiker 1	21		
Chemiker 2	7	20	
Chemiker 3	4	4	18

Diagonal gelesen entsprechen die Einträge in Tabelle 5 den von den einzelnen Chemikern beanstandeten Gruppen. Im Durchschnitt wurden 20 der 459 Gruppen oder 4% beanstandet. Das zeigt, dass die computergestützte Auswahl insgesamt als sehr gut empfunden wurde. Nur eine Gruppe wurde von allen drei Chemikern beanstandet. Mit 20% bis 35% waren die Übereinstimmungen zwischen den Prüfern generell eher gering. Alle von zwei Chemikern beanstandeten Gruppen wurden getrennt, wobei eine der Gruppen in drei neue und eine andere in vier neue Gruppen aufgeteilt wurde.

Bei den zur Substanzauswahl nutzbaren Algorithmen waren generell zwei Verfahren möglich. Die Gruppierung konnte entweder auf einem hierarchischen Verfahren beruhen oder es konnte ein Ähnlichkeitsbasierter Algorithmus genutzt werden. Hierarchische Verfahren gruppieren eine Anzahl von Parametern, die für jede Substanz vorher bestimmt wurden, in eine Matrix und sortieren diese aufgrund von Abständen zwischen diesen Parametern. Bei diesem Prozess entstehen baumartige Strukturen, welche vom ersten bis zum letzten Molekül abgearbeitet werden. Auf Ähnlichkeit basierende Systeme arbeiten nicht so streng linear. In diesen wird zufällig eine Verbindung gewählt, und deren Parameter werden mit einer zweiten zufälligen Verbindung verglichen. Sind beide Substanzen ähnlich, werden sie zusammengruppiert; falls die Ähnlichkeit jedoch nicht ausreicht, bildet die Substanz eine neue Gruppe. Die Ähnlichkeit wird - wie auch im hierarchischen Ordnungsverfahren - durch mathematische Operationen aufgrund der Parameter berechnet, wobei ein Grenzwert durch den Experimentator zu bestimmen ist. Dieser Grenzwert wurde im vorliegenden Fall automatisch so gewählt, dass ein Testset mit 10% der ursprünglichen Substanzen erhalten wurde. Beide Auswahlverfahren haben gewisse Vorteile. So ist der

ähnlichkeitsbasierte Ansatz zwar deutlich schneller und benötigt auch weit weniger Rechenleistung als der hierarchische, jedoch wählte er aus einer großen Anzahl von Verbindungen bevorzugt Verbindungen mit geringerer Atomanzahl aus.[126,202,203] Es ist jedoch zu beachten, dass auch hierarchische Algorithmen nicht in der Lage sind, ideale Gruppen zu erzeugen.[204] Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Gruppierung wurde mit dem OptiSim-Algorithmus ein ähnlichkeitsbasierter Ansatz genutzt.[126] Da das erzeugte Testset 10% der Gesamtsubstanzen umfasste, war die Tendenz, Substanzen mit wenigen Atomen zu wählen, nicht besonders ausgeprägt. Diese Bevorzugung wird ausgeprägter, je kleiner die ausgewählte Gruppe ist, und erst bei deutlich stärkeren Reduktionen würde dieser Fehler die Auswahl stark beeinflussen.[202]

Die während des Prozesses erzeugten Gruppen mit ähnlichen Verbindungen wurden nicht verworfen, sondern sollten im Falle einer aktiven Verbindung ebenfalls getestet werden. Vergleichbare Verfahren haben sich bereits im großen Maßstab als sinnvoll erwiesen. So wurden zum Beispiel die Wachstumsinhibitionstests des US-amerikanischen „National Cancer Institute“ (NCI) für solch eine Analyse genutzt. Das NCI hat die gemessenen Konzentrationen (ED_{50} -Werte) von jeweils 32.266 Substanzen gegen 18 repräsentative Krebszelllinien für die Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt. Diese Daten wurden dann genutzt, um zu untersuchen, ob sich solch ein Auswahlverfahren bewährt.[205] Die Substanzen wurden - wie auch in dem in dieser Arbeit genutzten Verfahren - gruppiert, so dass ungefähr 10% oder 3.000 der 32.266 Substanzen in einem chemisch diversen Testset enthalten waren. Bei einer aktiven Substanz wurden dann - ebenfalls wie in dem hier genutzten Verfahren - alle Mitglieder der Gruppe getestet. Die Rate, eine aktive Substanz zu erhalten, erhöhte sich durch dieses Verfahren um das 20- bis 40-fache.[205] Dies zeigt, dass die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Substanzauswahl trotz ihres geringen Umfangs ein nützliches Mittel war, um Tests durchzuführen.

6.2 Bewertung der Antibiotikatests

Der Antibiotikatest war die erste Probe des Testsets. Die Entscheidung, welche Bakterienstämme genutzt werden sollten, beruhte auf Empfehlungen der Organisation „Infectious Diseases Society of America“ (IDSA). Die IDSA ist ein Zusammenschluss von rund 9.000 Medizinern und Naturwissenschaftlern, der unter anderem den Senat und die Zulassungsbehörde der USA, die FDA, berät.[142,206] Die problematischsten gramnegativen Bakterien sind demnach *A. baumannii*, *E. coli* und verschiedene *Klebsiella*-Stämme.[142,206] *E. coli* und *Klebsiella spp.* haben als aerobe gramnegative Bakterien viele Gemeinsamkeiten, weshalb im Rahmen dieser Arbeit *E. coli*, *A. baumannii* und *P. auruginosa* getestet wurden. Unter den grampositiven Stämmen sind besonders die Vancomycin-resistenten *Enterococccen* und die multiresistenten *S. aureus*-Stämme problematisch.[142,206] Da *Enterococccen* als mikroaerophile Bakterien nur relativ aufwendig zu kultivieren sind[207], wurde auch in Absprache mit dem Beauftragten für biologische Sicherheit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie auf einen Test dieses Stamms verzichtet. Es wurde deshalb ein multiresistenter *S. aureus*-Stamm als grampositiver Bakterienstamm genutzt. Mit z-Faktoren über 0,7 verlief der Test in allen genutzten Bakterienstämmen sehr stabil. Insgesamt wurden 23 aktive Verbindungen bei bis zu 30 μM identifiziert. Damit lag die Identifikationsrate aktiver Verbindungen bei 1,16%. In *E. coli* und *A. baumannii* wurden neben einer schwach aktiven Verbindung zwei bereits bekannte antibiotische Verbindungen identifiziert. Dass keine aktive Substanz gegen *P. auruginosa* identifiziert werden konnte, war nach den Ergebnissen in den anderen gramnegativen Bakterien vermutet worden. Neben einer im Vergleich zu *E. coli* 100-mal weniger durchlässigen Zellmembran besitzt *P. auruginosa* auch eine Reihe von Antibiotika-neutralisierenden Enzymen und Transportproteinen.[208-210]

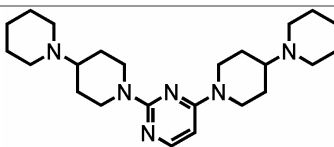
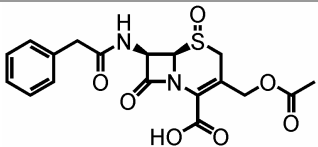
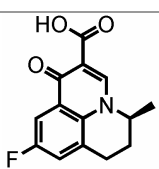
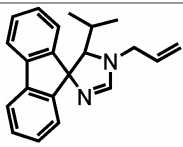
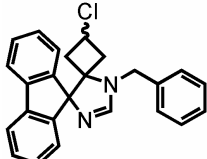
Im Gegensatz zur geringen Trefferquote in den drei gramnegativen Stämmen wurden allein in dem grampositiven Stamm 20 Antibiotika identifiziert. Die Hälfte von ihnen hatte allerdings mit einer MIC von 30 μM eher eine geringe Aktivität, wie Tabelle 6 zeigt.

Tabelle 6: Aktivität der gefundenen Verbindungen in *S. aureus*.

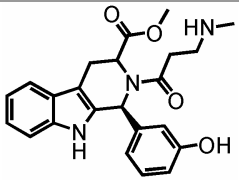
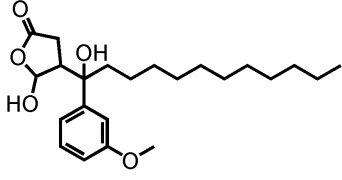
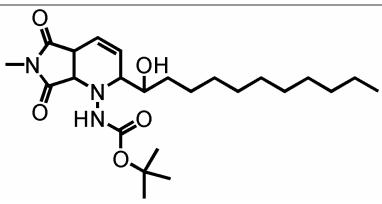
Aktive Substanzen bei 30 μM	Aktive Substanzen bei 15 μM	Aktive Substanzen bei 7,5 μM	Aktive Substanzen bei 3,3 μM
10	7	1	2

Die Gruppen mit den drei aktivsten Verbindungen beeinträchtigen zudem auch die Viabilität eukaryontischer Zellen, wie ein Vergleich mit den Toxizitätsdaten des Wnt-Reporter-Gen-Tests zeigt (Tab. 7). In Tabelle 7 konnte nur die Toxizität in den primären Tests miteinander verglichen werden, da von keiner der Gruppen ein Test aller ähnlichen Verbindungen im Wnt-Reporter-Gen-Test mit paralleler Zytotoxizitätsbestimmung gemacht wurde.

Tabelle 7: Vergleich der im Antibiotikatest aktiven Substanzen mit dem Wnt-Reporter-Gen-Test. Bei weniger als 80% Viabilität der untersuchten Zelllinie gilt eine Verbindung als toxisch.

Substanz	Aktivität im Antibiotikatest	Aktivität im Wnt-Reporter-Gen-Test bei 30 μM
 SP6790	30 μM gegen <i>E. coli</i>	77,4 \pm 8,7% Wnt-Aktivität
 STF0330	aktiv gegen <i>E. coli</i>	97,1 \pm 21,2% Wnt-Aktivität
 Flumequine; AC42	aktiv gegen <i>A. baumannii</i>	118,3 \pm 13,1% Wnt-Aktivität
 VUAR 031	30 μM gegen <i>S. aureus</i>	15,8 \pm 2,5% Wnt-Aktivität 69,1 \pm 1,8% Viabilität
	15 μM gegen <i>S. aureus</i>	98,1 \pm 7,8% Wnt-Aktivität

6. Diskussion

 VUAR 029	30 μM gegen <i>S. aureus</i>	0,6 \pm 0,1% Wnt-Aktivität 63,2 \pm 0,9% Viabilität
 VS-25	15 μM gegen <i>S. aureus</i>	0,3 \pm 0,1% Wnt-Aktivität 79,1 \pm 4,3% Viabilität (21,7 \pm 2,5% Wnt-Aktivität 90 \pm 3% Viabilität bei 10 μM)
 LW 88	30 μM gegen <i>S. aureus</i>	110,4 \pm 11,2% Wnt-Aktivität

Die Toxizität der im bakteriellen Test aktivsten Verbindungen VUAR 031, VS-25 und LW 88 zeigte, dass es sich bei den untersuchten Substanzen nicht um Antibiotika, sondern um Zellgifte handelt. Das bedeutet, dass diese Substanzen einen zellulären Prozess stören, der sowohl in Bakterien als auch in eukaryotischen Zellen essenziell ist. Es gelang somit nicht, neben den drei bekannten Antibiotika neue, sehr aktive Substanzen zu identifizieren, die als mögliche neue Leitstrukturen dienen könnten. Die weniger aktiven Substanzen könnten allerdings durchaus als Ausgangspunkte für die Synthese neuer aktiverer Substanzen genutzt werden. Mit den Tetramsäuren wurde zwar ebenfalls eine bekannte antibiotische Substanzklasse identifiziert, die aber durchaus klinische Relevanz besitzt.[211] In einer aktuellen Studie wurde Reutericyclin mit guten Ergebnissen zur Behandlung von oberflächlichen *S. aureus* Infektionen eingesetzt, wobei auch multiresistente Stämme und Biofilme effektiv abgetötet wurden.[211] Eine weitere Möglichkeit, aktive Substanzen zu identifizieren, würde in weiteren Tests liegen. Das grundlegende Prinzip des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tests wurde bereits 1929 von A. Fleming bei der Entdeckung des Penicillins genutzt.[212] Neuere Methoden nutzen zum Beispiel mit siRNA transfizierte Zellen. Dadurch wird die Proteinmenge eines wichtigen bakteriellen Enzyms reduziert und auch weniger starke Antibiotika können erkannt und in

folgenden Untersuchungen verbessert werden.[129,213] Andere Verfahren, die ebenfalls auf ein Zielprotein zugeschnitten sind, können auf Kristallstrukturen basieren. Durch diese Strukturinformationen lassen sich in Kombination mit computergestützter Bindungspartnersuche neue Inhibitoren identifizieren, welche anschließend hinsichtlich ihrer Bioverfügbarkeit verbessert werden können.[214] Auch ohne Strukturinformationen können direkte Inhibitionsstudien mit für das Bakterium essenziellen Enzymen wichtige Ansatzpunkte der Antibiotikaentwicklung bieten.[215,216] Um frühzeitig Wirkmechanismen bekannter Antibiotikaklassen zu identifizieren und dadurch die Wiederentdeckung bereits bekannter Naturstoffe zu verhindern, ist es sinnvoll, Reporter-gen-Tests einzusetzen.[217,218] Ein weiterer vielversprechender Ansatz liegt in der Blockierung von RNA-Riboswitches, welche normalerweise die Translation in Bakterien regulieren.[219,220] Zusätzlich zu den beschriebenen gibt es verschiedene weitere Methoden, die in Übersichtsartikeln zusammengefasst wurden.[221,222]

6.3 Evaluation der Untersuchungen des Wnt-Singalwegs

Die Entwicklung und Durchführung eines Tests zur Identifikation von Modulatoren des Wnt-Signalwegs war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit. Zu Beginn der Assayentwicklung wurde mit einem phänotypischen Test gearbeitet. Dieser Test erwies sich aber als zu anspruchsvoll für eine Automation. So stellt die automatische Fokussierung ungefärbter Zellen ein großes Problem dar, was in vielen Veröffentlichungen durch Färbung der DNA mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI oder Hoechst und anschließender Fokussierung darauf umgangen wurde.[223-225] Diese einfache Färbung nutzte auch der einzige bisher beschriebene phänotypische Test für den Wnt-Signalweg. Dieser Test basiert auf der Translokation von β -Catenin in den Zellkern nach Aktivierung des Signalwegs, wobei das β -Catenin mittels Immunfluoreszenz angefärbt werden musste.[226] Wird auf eine Färbung verzichtet, ergibt sich ein schwerwiegendes Problem, da Durchlichtaufnahmen im Gegensatz zu Fluoreszenzaufnahmen mehrere Ebenen aufweisen, in denen der automatische Fokus ein scharfes Bild

findet (Abb. 49). Dadurch wird eine automatische Bildauswertung erheblich erschwert.

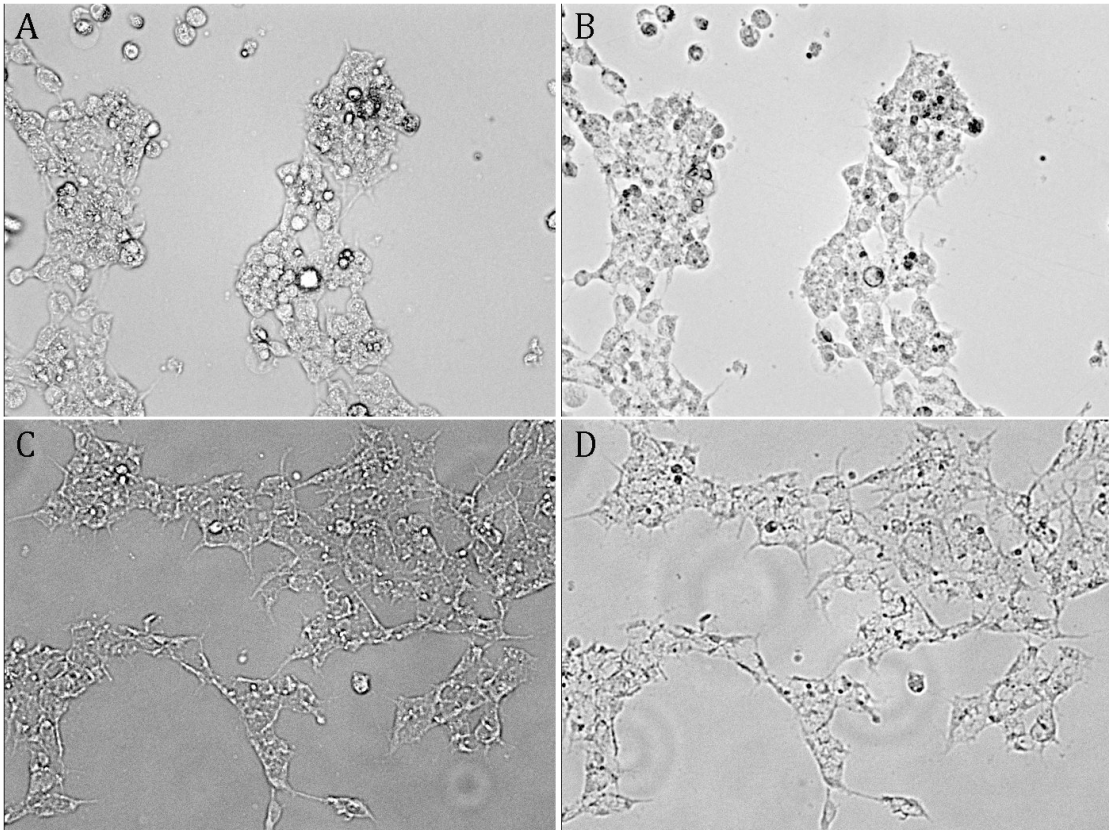


Abbildung 49: Mittels automatischer Fokussierung erzeugte Durchlichtaufnahmen. A) und B) Automatisch erzeugte Hellfeldaufnahmen. C) und D) Automatisch erzeugte Phasenkontrastaufnahmen. A) und C) Durch den Fokus erscheint die Zellmembran dunkel und die Zelle hell. B) und D) Durch den Fokus erscheint die Zellmembran hell und die Zelle dunkel.

Ein zweites Problem bestand darin, dass die für automatische Erkennung genutzte Morphologie der C57MG-Zellen nicht allein vom Wnt-Signalweg abhing. Apoptosefördernde oder zellzyklusbeeinflussende Substanzen würden letztendlich auch die Morphologie beeinflussen, eine Tatsache, die in anderen Zelllinien bereits beschrieben wurde und die zeigt, dass wahrscheinlich viele Substanzen in dem phänotypischen Test fälschlicherweise identifiziert worden wären.[227] Für die weitere Assayentwicklung wurde deshalb ein Reportergen-Test verwendet. Die für diese Untersuchungen gewählte Reportergen-Zelllinie reagierte sehr stark auf die Aktivierung durch Wnt3a-Protein, da sie zusätzliche Kopien des Rezeptors Frizzled2 auf ihrer Oberfläche trägt. Im Wnt-Signalweg findet - anders als in vielen anderen Signalwegen - keine starke Amplifikation des Signals durch den Rezeptor statt. Der Rezeptor hat eher einen stöchiometrischen Einfluss auf die Signalstärke (siehe Kap. 1.2.2).[228] Mathematische Modelle, die

auf Proteinkonzentrationen im Extrakt von *X. leavis*-Eiern basieren, zeigten, dass Axin ein entscheidender Faktor des Signalwegs ist.[229,230] In der Reporterzellenlinie waren durch verstärkte Expression des Rezeptors Frizzled2 mehr Bindepartner für Axin vorhanden, und da dessen Bindung der entscheidende Schalter des Wnt-Signalwegs ist, sprach die Reporterzellenlinie außerordentlich sensibel auf Wnt3a-Protein vermittelte Aktivierung an.

Da die genutzte Zellenlinie eine Reduktion der Zellzahl ermöglichte, wurde auch die Anzahl der Zell-Zell-Kontakte reduziert, was wiederum zu einer verminderten Beeinflussung des Tests durch Signale benachbarter Zellen führte. β -Catenin besitzt neben seiner Funktion im Wnt-Signalweg nämlich noch eine weitere Aufgabe in der Zelladhäsion. Es bindet an Cadherine und vermittelt dadurch die Verankerung des Aktin-Zytoskeletts an den Zell-Zell-Kontakten. Diese zwei β -Catenin-Reservoirs, das membrangebundene und das im Wnt-Signalweg gebundene, stehen in einem dynamischen Austausch zueinander.[231,232] Diese Wechselwirkung kann zu einer Modulation des Wnt-Signalwegs durch Signale der Zelladhäsionsmaschinerie führen.[233,234] Der Wnt-Signalweg und damit auch der Reporterzellen-Test können allerdings noch durch eine Vielzahl anderer Faktoren und Signalwege beeinflusst werden. In Abbildung 50 sind einige wichtige interferierende Signalwege dargestellt.

Die Mehrzahl der in Abbildung 50 beschriebenen Signalwege hat einen aktivierenden Effekt auf den Wnt-Signalweg. Nimmt man an, dass viele der getesteten Verbindungen an einem Punkt dieses Signalnetzwerks wirken, kann erklärt werden, warum 228 der 615 untersuchten Substanzen (37%) einen aktivierenden Einfluss im Reporterzellen-Test zeigten.

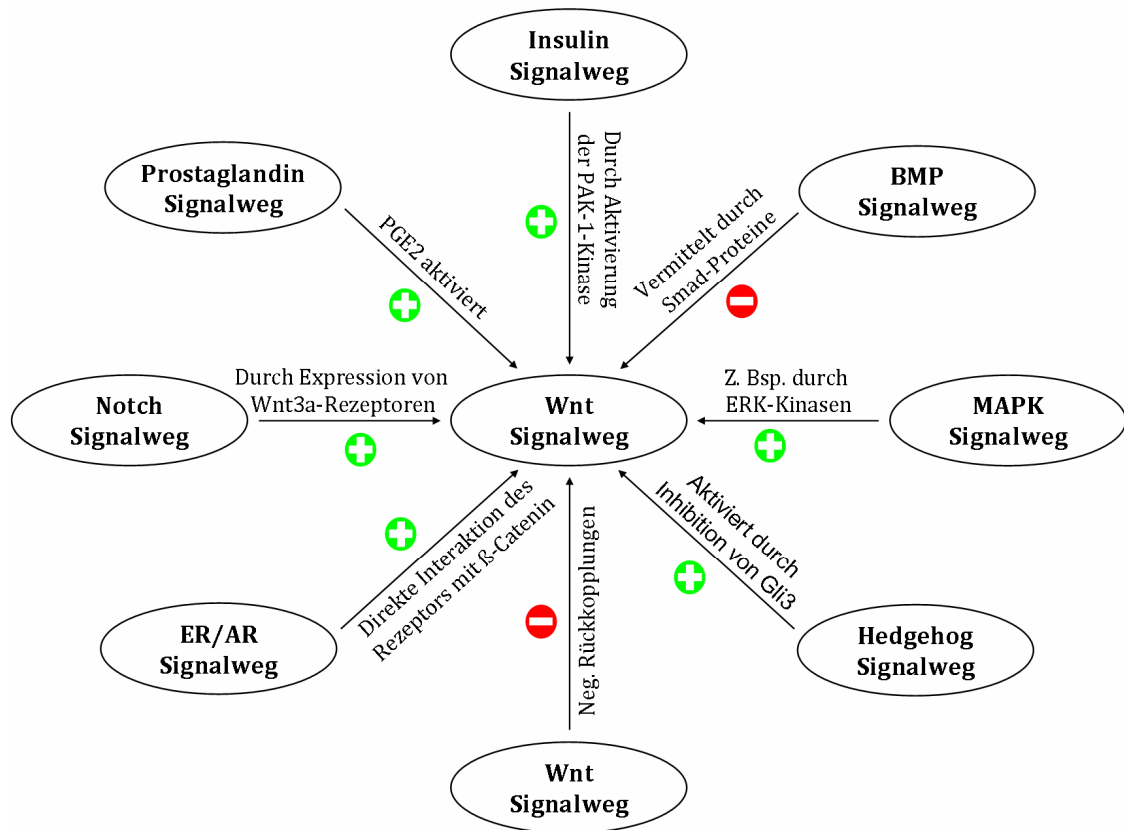


Abbildung 50: Modulation des Wnt-Signalwegs durch andere Signalwege. Mit ER/AR-Signalweg (Estrogen/Androgen) ist der Signalweg der steroidalen Sexualhormone abgekürzt. BMP ist das Akronym von „bone morphogenetic protein“ und MAPK steht für die Signalwege, die „mitogen-activated protein kinases“ nutzen. Die Aufstellung der Signalwege ist nicht vollständig. Es werden keine vom Wnt-Signalweg ausgehenden Modulationen dargestellt. Die einzige Ausnahme sind Rückkopplungsschleifen des Wnt-Signalwegs selbst.

Da eine vollständige Aufstellung aller Mechanismen, die zu einer Veränderung des Wnt-Signalwegs führen können, außerordentlich komplex ist, wurden einige Einschränkungen vorgenommen. Zum einen sind in Abb. 40 nur einige repräsentative und bedeutsame Signalwege dargestellt. So wurde zum Beispiel das Gebiet der Interleukine und der immunologischen Signalwege im Allgemeinen ausgespart.[235,236] Zum anderen wurde, mit Ausnahme des Wnt-Signalwegs selbst, auf die Beschreibung von Wechselwirkungen des Wnt-Signalwegs mit den beeinflussenden Signalwegen verzichtet. Unter der Vielzahl der Wechselwirkungen wurden außerdem nur die dominierenden aufgeführt. So gibt es zum Beispiel im Falle des Wnt-Signalwegs auch positive Rückkopplungen[155], jedoch überwiegen die negativen bei weitem[155,237-240]. Aufgrund der Komplexität dieses Netzwerks sind viele Interaktionen auch noch nicht genau bekannt. So aktiviert Prostaglandin E2 zwar den Wnt-Signalweg[241], aber über die molekularen Ursachen gibt es bisher nur erste

Hinweise[242]. Ein ähnliches Beispiel ist der Zusammenhang zwischen dem Geschlecht eines Patienten und der Wahrscheinlichkeit, an Darmkrebs zu erkranken. Männer jeder Altersgruppe haben laut einer Meta-Analyse mit 920.000 Personen ein fast 2-fach erhöhtes Risiko zu erkranken[243] und auch der Überlebenszeitraum nach Stellung der Diagnose ist bei jungen Männern mit 14 Monaten deutlich kürzer als bei gleichaltrigen Frauen, die im Durchschnitt 17 Monate überleben.[244] Diese Beobachtung wurde schon gemacht, als noch nicht bewiesen war, dass eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs aus einer direkten Interaktion des Estradiol-[245,246] oder Androgen-Rezeptors[247] mit β -Catenin resultieren kann. Die beiden entwicklungsphysiologisch wichtigen Signalwege Notch und Hedgehog werden stark durch den Wnt-Signalweg beeinflusst, jedoch wirken sie auch durch Repression des Proteins Gli3 im Falle des Hedgehog-Signalwegs[248,249] oder durch verstärkte Expression verschiedener Zielgene im Falle des Notch-Signalwegs[250,251] auf den Wnt-Signalweg zurück. Der Insulin-Signalweg moduliert an mehreren Stellen den Wnt-Signalweg.[252,253] Zum einen sind die Korezeptoren LRP5 und 6 wichtige Rezeptoren des Fettsäurestoffwechsels, und zum anderen führt Insulin zur Aktivierung der Kinase PAK-1[254]. Eine direkte Wechselwirkung durch GSK-3 β , eines entscheidenden Enzyms des Zuckerhaushalts, wurde bisher nicht beschrieben. Es ist anzunehmen, dass Kompartimentierung und Bindung durch Axin einen unbeeinflussbaren Pool an GSK-3 β erzeugen, wie er für ähnliche Wechselwirkungen bereits beschrieben ist.[255] Die für die Krebsentstehung wichtigen MAP-Kinase-Signalwege (MAPK) interagieren durch die Kinase p38[256], die Jun-Kinase[256] und die ERK-Kinasen[256-259] mit dem Wnt-Signalweg. Der BMP-Signalweg, selbst Teil der MAPK-Signalwege, kann durch Aktivierung der Smad-Transkriptionsfaktoren noch auf eine weitere Art den Wnt-Signalweg aktivieren.[260,261]

Bei bekannten Naturstoffen, welche sich in der Substanzauswahl befanden, konnte auch direkt gezeigt werden, dass andere Signalwege als Auslöser für die gemessene Aktivität im Wnt-Signalweg verantwortlich waren. So ist zum Beispiel die drittaktivste Substanz im Testset mit einer Aktivierung von $220 \pm 40\%$ bei $10 \mu\text{M}$ und $163 \pm 37\%$ bei $1 \mu\text{M}$ Rutaecarpine (Labornamen AC04, Mol. Id. 5094). Dieser Naturstoff ist Bestandteil der Früchte der Stinkesche (Tetradium), welche als Wu-Chu-Yu in der traditionellen chinesischen Medizin eingesetzt

werden.[262,263] Eine der molekularen Wirkungen dieses Naturstoffs ist die Inhibierung der MAP-Kinasen p38 sowie ERK1 und 2.[264] Trotz dieses indirekten Effekts auf den Wnt-Signalweg ist die Substanz der stärkste identifizierte Aktivator bei 1 μ M.

Auch unter den Inhibitoren wurden verschiedene nicht-Wnt-spezifische Substanzen identifiziert. So zum Beispiel Tetrahydropapaverolin (Labornamen AC59, Mol. Id. 5149), ein nekroseauslösender Naturstoff[265], oder Emeritin (Labornamen AC96, Mol. Id. 5186), ein Proteinbiosynthese-Inhibitor[266,267].

Nur ein Ansatz wie die Affinitätsaufreinigung, der die Vielzahl der Wechselwirkungen berücksichtigen kann, ist auch in der Lage, die verschiedenartigen molekularen Ziele der getesteten Verbindungen zu identifizieren. Der in dieser Arbeit genauer charakterisierte Wnt-Inhibitor SR56 (Kap. 5.3.4) wäre ebenfalls durch diese Methode untersucht worden, wenn die Resynthese erfolgreich verlaufen wäre. Die Wirksamkeit der Substanz sowohl nach der Aktivierung mit Lithium als auch in der Krebszelllinie SW480 und nach Inkubation mit cytosolischen Proteinen deutete auf eine Inhibition des Signalwegs auf Ebene der Transkription hin. Da die Transkription des Zielgens der letzte Teil der Signalkaskade ist, ist eine dort wirkende Substanz unabhängig von den verschiedenen bereits beschriebenen oberhalb auftretenden Mutationen.[161,268,269] Bisher sind nur wenige solcher Inhibitoren für den Wnt-Signalweg identifiziert worden[158], was die Substanz außerordentlich spannend gemacht hätte.[270]

Um die molekularen Ziele der aktiven Substanzen genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Affinitätsaufreinigung genutzt. Allerdings sind bei dieser Methode verschiedene Faktoren zu berücksichtigen. Bereits bei der Synthese der Sonde ist auf die Länge und Hydrophobizität des Linkers zu achten. Zu kurze Linker führen durch die Nähe zur Affinitätsmatrix zu sterischen Problemen, während längere hydrophobe Linker in wässrigen Puffern aggregieren und dadurch die gebundene Substanz nicht mehr mit den Zielproteinen interagieren kann.[271] Um diese Probleme zu umgehen, wurden verschiedene Linkersysteme auf Basis von Polyethylenglykol[272-274], L-(+)-Tartrat[273], Ethylenglycoldiglyceridylether[275] Aminocaproylaminopentyl-oxycidylether[271] oder auch Poly-L-Prolin[276] entwickelt. Jeder dieser Linker hat besondere Eigenschaften. So bildet Poly-L-Prolin zum Beispiel eine stabile

Helix in wässrigem Milieu, was zu einem genau definierten Abstand zwischen gebundener Substanz und Matrix führt.[277] Generell sind aber die auf Polyethylenglycol basierten Systeme die am häufigsten genutzten Linker[10]; daher wurden sie auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

Von den drei gebräuchlichen Methoden zur Affinitätsaufreinigung (Kap. 1.1)[10] wurde aufgrund der mikromolaren Aktivität der Aktivatoren weder die serielle noch die kompetitive Methode genutzt. Es war zu befürchten, dass die Affinität der Substanz für diese Ansätze möglicherweise nicht ausreichen würde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die komparative Affinitätsaufreinigung genutzt, welche die identifizierten Proteine einer Aufreinigung mit einer aktiven Substanz mit denen einer inaktiven Kontrollsubstanz vergleicht. Diese Methode war bereits in der Abteilung etabliert und erwies sich auch für niederaffine Substanzen als geeignet.[165] Die Kontrollsubstanz und die aktive Substanz sollten für diese Aufreinigung sehr ähnlich sein, idealerweise handelt es sich um zwei Isomere der selben Substanz. Das war aber im Falle der Oxepan-Bibliothek nicht möglich, da eine Trennung der verschiedenen Stereoisomere nicht gelang (Kap. 5.3.5.; Abb. 42).

Die durch den tryptischen Verdau der Proteine der Affinitätsaufreinigung erzeugten Peptide wurden durch NanoHPLC chromatographisch aufgetrennt, direkt mittels MS analysiert und durch die MASCOT-Software mit der SwissProt Datenbank identifiziert (Kap. 5.3.5). Trotz der Vielzahl an verfügbaren Methoden, bestimmte Proteinfragmente zu markieren und anzureichern (Kap. 1.1), wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Fragmente ohne vorherige Behandlung analysiert. Die Etablierung einer neuen, sensitiveren Methode, welche markierte Peptide nutzen würde, war nicht Ziel dieser Arbeit und hätte einen erheblichen Validierungsaufwand bedeutet. Die eingesetzte MASCOT-Software nutzt einen auf Wahrscheinlichkeiten basierten Algorithmus, der die Identifizierung von signifikanten Ergebnissen und den Vergleich verschiedener Versuche untereinander erleichtert.[278] Zwar stehen noch andere Softwarelösungen für die Identifizierung von Peptidfragmenten zur Verfügung, jedoch ist ein Vergleich dieser Methoden nicht möglich, da ein gemeinsamer Benchmark-Test fehlt und die Berichte über die Stärken der unterschiedlichen Softwarelösungen widersprüchlich sind.[279]

Die MASCOT-Suche ergab im Falle der humane Proteine enthaltenden SwissProt-Datenbank 48 Proteine, die nur an die Probe banden, und neun solche Proteine bei der Suche in der gesamten Datenbank. Die Liste der 48 humanen Proteine beinhaltet Proteine der verschiedensten Funktionen und zeigt, dass unter Verwendung dieser Datenbank ein stringenteres Waschprotokoll geeigneter gewesen wäre. Unter den in der gesamten Datenbank gefundenen Proteinen wurden die drei Proteine Vang1, Cdc2 und Pesc gefunden und untersucht; Cdc2 und Pesc erwiesen sich in den anschließenden Konkurrenzexperimenten allerdings als nicht spezifisch (Kap. 3.3.5). Im Folgenden sollen die drei untersuchten Proteine näher vorgestellt werden, und es soll auch eine Einbettung der Ergebnisse in den Wnt-Signalweg erfolgen.

Zum ersten Mal wurde das Pescadillo-Protein (Pesc) 1996 durch Mutantanalysen im Zebrafisch beschrieben, wo es unter anderem eine Rolle bei der Entwicklung der Augen spielt.[280,281] Dieser Phänotyp deutet auf ein Protein des Wnt/PCP-Signalwegs hin, was bisher aber nicht ausreichend belegt werden konnte.[281] Als molekulare Prozesse, bei denen das Pescadillo-Protein beteiligt ist, wurden die Ribosomen- und Nucleolusbiogenese sowie Funktionen in der Zellzykluskontrolle und der Chromosomenstabilität identifiziert.[282-284] Insgesamt ist die Rolle des Proteins im Wnt/PCP-Signalweg nicht ausreichend belegt, um es sicher in das Signalnetzwerk der Wnt-Signalwege integrieren zu können. Dadurch ist eine abschließende Beurteilung der Ergebnisse nicht möglich.

Das Protein Cdc2 ist besser unter dem Namen „Cyclin dependent kinase1“ (Cdk1) bekannt. Diese Kinase ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und wird für den Übergang der G2- zur M-Phase benötigt.[285,286] Die Identifizierung in vier von fünf Affinitätsaufreinigungen kann nur teilweise durch das hohe Expressionslevel des Proteins erklärt werden, da dies auch zu einer vermehrten Bindung an das Kontrollmolekül hätte führen müssen.[286,287] Wahrscheinlich kommt zu diesem Sachverhalt noch die Verschiedenartigkeit des Kontrollmoleküls hinzu. Es wäre möglich, dass überlagernde Signale die Identifikation des Proteins in der Kontrolle verhinderten. Eine Einordnung in den Wnt-Signalweg ist bei diesem Protein schwierig und nur indirekt möglich. Zwar sind verschiedene zellzyklusregulierende Proteine Zielgene des Wnt-Signalwegs, aber für Cdk1 ist solch eine Regulation nicht bekannt.[155] Neuere Forschungen zeigen, dass der

Wnt-Signalweg durch die CyclinY-abhängige Kinase PFTK reguliert werden kann. Diese Kinase aktiviert den Wnt-Signalweg beim Übergang von der G2- zur M-Phase durch Phosphorylierung von LRP5/6.[288] Damit ist eine funktionelle Verbindung zwischen der Aktivierung des Wnt-Signalwegs und dem Übergang von der G2- zur M-Phase, an dem die Cdk1-Kinase beteiligt ist, gezeigt worden. Eine direkte Verbindung wurde aber nicht gefunden, wobei dies wahrscheinlich Gegenstand weiterer Forschung sein wird.

Das einzige direkte Wnt-signalwegsspezifische Protein in der Liste ist Vang1 (Van-Gogh-Like-Protein 1), dessen homologes Protein Vang2 in der nur humane Proteine enthaltenden SwissProt-Datenbank identifiziert wurde. Beide Proteine sind an der embryonalen Entwicklung der Niere beteiligt[290], dem Ursprungsgewebe der verwendeten Zelllinie HEK293, welche aus embryonalem Nierengewebe erzeugt wurde.[291] Dass nicht beide Proteine unter beiden Suchbedingungen identifiziert wurden, ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die Proteinmengen im Bereich der Nachweisgrenze lagen. Membranproteine werden durch den eingesetzten Lysispuffer nicht vollständig solubilisiert, und das Expressionsniveau dieser Proteine ist wahrscheinlich generell nicht sehr hoch.

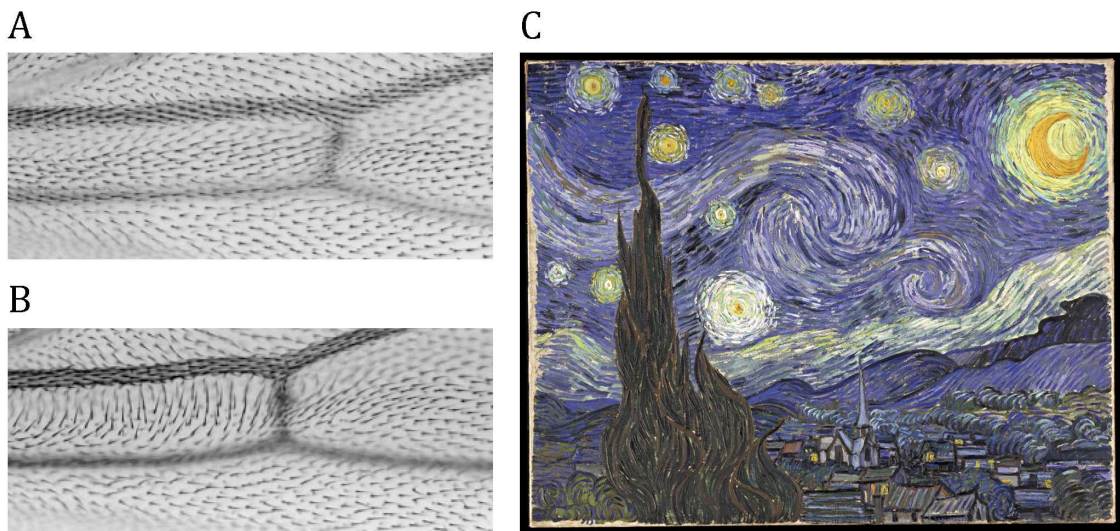


Abbildung 51: Darstellung der namensgebenden Analogie der Van Gogh-Mutation. A) C'-Region des Flügels einer Wildtyp-D. melanogaster. B) C'-Region des Flügels einer D. melanogaster mit einer Mutation in dem Van Gogh-Locus. C) Gemälde Sternennacht, Öl auf Leinwand 73 x 92 cm von Vincent Willem Van Gogh. A)-B) Wurden entnommen aus P. N. Adler et al.[289] C) Dieses Kunstwerk ist gemeinfrei und befindet sich in der Sammlung des Museum of Modern Art in New York City.

Die Funktion der Van-Gogh-Like-Proteine und des gesamten Wnt/PCP-Signalwegs ist bisher in niederen Modellsystemen wie zum Beispiel *D.*

melanogaster untersucht worden.[289] Dort spielt das Protein eine wichtige Rolle in allen Prozessen, die durch den Wnt/PCP-Signalweg gesteuert werden. Dazu zählen unter anderem die Orientierung der Haare auf dem Körper und den Flügeln und die Orientierung der Photorezeptoren in den Omatidien.[103,106,289] Die Orientierung der Borsten auf Flügeln gab dieser Mutation auch den Namen, erinnert ihre geschwundene Form doch an die Pinselführung von Vincent Willem Van Gogh (Abb. 51). Diese Untersuchungen lassen sich aber nur bedingt auf höhere Wirbeltiere übertragen, da im Zuge der Evolution 2 Van-Gogh-Like-Proteine entstanden sind.[292,293] Beide Proteine haben teilweise unterschiedliche Aufgaben, was zum einen durch Vergleiche der Expressionsmuster deutlich wird[294,295]; zum anderen zeigen Mutanten dieser Proteine stark unterschiedliche Phänotypen. Der Verlust beider *Vang1*-Allele führt in der Maus nur zu einer fehlerhaften Anordnung der Cilienbündel in der Cochlea[290], wohingegen der Verlust beider *Vang2*-Allele neben anderen Fehlbildungen zu schwersten Neuralrohrdefekten führt (Krankheitsbild: Craniorachischisis) [296,297]. Trotz dieser Unterschiede gibt es überlappende Funktionen; so lässt sich die Schwere der Phänotypen durch das jeweils andere homologe Protein reduzieren und auch die heterozygoten Mutanten zeigen stärkere Phänotypen, wenn das homologe Protein ebenfalls heterozygot mutiert vorliegt.[290] Die beschriebenen Mutanten resultieren aus einem fehlerhaften Wnt/PCP-Signalweg, jedoch konnte für das Van-Gogh-homologe Protein *Stbm* aus dem Zebrafisch auch ein antagonistischer Effekt auf den kanonischen Wnt-Signalweg gezeigt werden.[298] Wurde die antagonistische Wirkung durch RNA-Interferenz aufgehoben, stieg das Reporter-gen-Signal um den Faktor 2[298], ähnlich wie bei der Gabe von Oxepanen (Kap. 5.3.5). In einer Studie des Prickle-Proteins aus *D. melanogaster*, welches direkt mit dem Van-Gogh-Protein interagiert, reduzierte sich die Signalstärke des kanonischen Wnt-Signalwegs nach Überexpression ebenfalls um den Faktor 2.[299] Als Hypothese könnte deshalb formuliert werden, dass es sich bei den Oxepanen um Inhibitoren der Proteininteraktion des prickle-Like-Proteins, als humanes homologes Protein zu Prickle, mit der Van-Gogh-Like-Proteinfamilie handelt, was durch zukünftige Experimente allerdings noch belegt werden muss.

Besonders geeignet wären funktionelle Studien in Modellorganismen wie *D. melanogaster* oder biophysikalische Untersuchungen mittels „surface plasmon

resonance“ (SPR), „fluorescence polarisation“ (FP), „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) oder „isothermal titration calorimetry“ (ITC), um eine direkte Wechselwirkung der Oxepane mit Vang oder Prickle-Like-Proteinen zu zeigen. Abbildung 52 fasst die gewonnenen Daten und die darauf resultierenden Schlussfolgerungen zusammen.

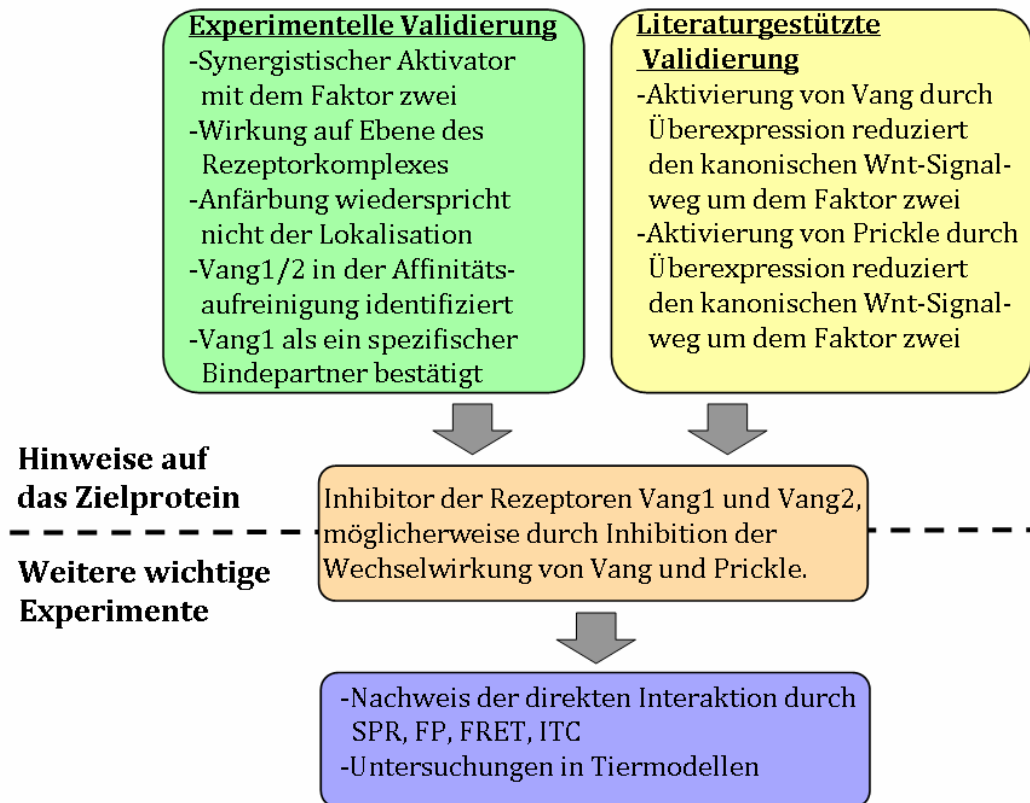


Abbildung 52: Zusammenfassung der gewonnenen Daten und Darstellung der daraus resultierenden Hypothese.

7. Zusammenfassung der Arbeit

Ein Ziel der Chemischen Biologie ist die Identifizierung und Bereitstellung neuer biologisch aktiver Substanzen. Diese Substanzen dienen idealerweise nicht nur als Sonden zur Aufklärung grundlegender Fragestellungen sondern auch als Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung. Es war deshalb ein wichtiges Ziel dieser Arbeit - in Kooperation mit organischen Chemikern der Abteilung - neue, biologisch aktive Moleküle und Sonden zu entwickeln.

Eine Kooperation mit Dr. L.-G. Milroy (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) befasste sich mit der Erstellung einer detaillierten Struktur-Wirkungsbeziehung für aktinbindende Analoga aus der Gruppe der Jaspamide und Chondramide. Diese marinen Naturstoffe sind potente Aktinstabilisatoren und verhindern dadurch die Zellteilung. Sie sind deshalb als mögliche Ausgangspunkte für die Entwicklung von Krebsmedikamenten interessant. Es wurden in zwei relevanten Zelllinien für 25 Verbindungen Dosis-Wirkungsbeziehungen erstellt. Diese Daten ermöglichten zum einen den Vergleich der Aktivitäten der Analoga mit denen der bereits bekannten Naturstoffe und zum anderen wurden sie für die Entwicklung einer detaillierten Struktur-Wirkungsbeziehung genutzt, welche als Ausgangspunkt weiterer Arbeiten diente.

Eine weitere Kooperation mit S. Schoof und S. Baumann unter Leitung von Dr. Arndt (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) zielte auf die Analyse antibiotischer Naturstoffderivate des Thiostreptons, eines in der Veterinärmedizin zugelassenen Antibiotikums. Durch Semisynthese war es der Gruppe von Dr. Arndt gelungen eine Kollektion modifizierter Thiostreptonderivate herzustellen, welche im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Wirksamkeit untersucht wurden. Neben antibiotischen Tests wurden auch Untersuchungen in eukaryontischen Zellkulturen durchgeführt. Da das molekulare Ziel der Thiopeptide, zu denen auch Thiostrepton gehört, das bakterielle Ribosom ist, wurde eine Wechselwirkung mit dem dazu ähnlichen mitochondrialen Ribosom vermutet. Anfärbungen von BSC-1-Zellen mit einer fluoreszenten Thiostreptonsonde im Rahmen dieser Arbeit und auch

biochemische Studien von S. Baumann bestätigten eine Wechselwirkung mit dem mitochondrialen Ribosom.

Eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Niemeyer an der Technisch Universität Dortmund beschäftigte sich mit einer gänzlich anderen Fragestellung. Diese Arbeitsgruppe entwickelt Methoden zur Mikrostrukturierung von Oberflächen. Im Rahmen der Kooperation wurde in Zusammenarbeit mit Dr. H. Schröder der Einsatz von Mikroarrayoberflächen in der Zellkultur untersucht. Die Herausforderung bestand in der Entwicklung einer geeigneten Kultivationsbedingung, die eine effektive Besiedelung der Mikrostrukturen erlaubte. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden verschiedene Peptidkonjugate zur stabilen Verankerung der Zellen auf den Mikrostrukturen untersucht. Zyklische RGD-Peptide erwiesen sich dabei als überlegen gegenüber linearen RGD-Peptiden, ein Ergebnis, das die verschiedenen Affinitäten dieser Peptide zum Integrin-Rezeptor widerspiegelt. Interessanterweise konnten eukaryontische Zellen auch effizient Mikrostrukturen aus DNA-Konjugaten binden.

In einer weiteren Kooperation mit S. Koch (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) wurde eine Sonde zur Untersuchung der zellulären Palmytylierungsmaschinerie erzeugt. Die dynamische De- und Repalmytylierung des Ras-Proteins spielt eine wichtige Rolle im EGF-Signalweg, weshalb die Regulation dieses Proteins von großem onkologischen Interesse ist. Um die Spezifität der de- und repalmytylierenden Enzyme zu untersuchen, war es nötig, ein künstliches Substrat für diesen Prozess herzustellen. Zu diesem Zweck wurde ein EGFP-Konstrukt mit einem zusätzlichen Cystein am C-Terminus kloniert. Nach Expression des EGFP-Konstrukts durch C. Nowak konnte sie mittels MIC-Ligation ein palmytylierbares Peptid, welches dem C-Terminus des Ras-Proteins entsprach, mit dem EGFP-Protein verknüpfen. Durch die so erhaltene Sonde waren zelluläre Studien möglich, die den Prozess und die Spezifität der De- und Repalmytylierung weiter aufklärten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Kooperation mit S. Wetzel eine Methode entwickelt, welche es erlaubte aus der abteilungseigenen Substanzdatenbank eine geeignete Auswahl an Verbindungen zu erzeugen, welche repräsentativ in zellulären Testsystemen untersucht werden konnten. Hierfür wurden zunächst durch die Aufstellung von vier einfachen Kriterien,

welche die Löslichkeit, die Verfügbarkeit und die chemische Struktur der Verbindungen umfassten, diejenigen Substanzen aus der abteilungseigenen Substanzdatenbank ausgewählt, die für zelluläre Tests besonders geeignet waren. Diese Substanzen wurden durch den OptiSim-Algorithmus nach chemischer Ähnlichkeit in Gruppen mit durchschnittlich zehn Mitgliedern sortiert, wobei jeweils die für diese Gruppe repräsentative Verbindung in eine neue Auswahl aufgenommen wurde. Die auf die Weise erzeugte Auswahl beinhaltete 479 Verbindungen, die nach chemischer Diversität und biologischer Relevanz ausgewählt worden waren. Neben dem Einsatz in Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte die erstellte Substanzauswahl auch bereits von mehreren Mitarbeitern der Abteilung sowie von externen Kooperationspartnern in zellbasierten Tests eingesetzt werden. Der für die Substanzauswahl entwickelte Algorithmus kann außerdem jederzeit neue, für zelluläre Tests geeignete Substanzbibliotheken generieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem zwei zelluläre Tests entwickelt, um neue biologisch aktive Substanzen in Anwendungsgebieten zu identifizieren, welche bisher nicht in der Arbeitsgruppe untersucht wurden.

Einer der in dieser Arbeit etablierten zellulären Tests sollte sich mit der Identifizierung neuer antibiotischer Verbindungen beschäftigen. Zum einen müssen dringend neue potente Antibiotika entwickelt werden, um ältere und mittlerweile weniger effektive Medikamente zu ersetzen, und zum anderen verspricht die Untersuchung naturstoffinspirierter Substanzbibliotheken einen hohen Anteil aktiver Verbindungen. Das Ziel, eine zuverlässige Methode zur Identifizierung neuer antibiotischer Verbindungen zu etablieren, konnte durch die Anwendung der DIN 58940, die durch Verwendung der System-Duetz-Abdeckungen weiter optimiert wurde, erreicht werden. Der Einsatz von vier klinisch erprobten Bakterienstämmen erlaubte es, die erhaltenen Daten in ihrer Relevanz einzuordnen. Mit den substituierten β -Carbolin-Hydantoin-Verbindungen wurde eine Substanzklasse identifiziert, deren Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich liegt. Für die untersuchten Tetramsäurederivate ist es zudem gelungen, ihre Wirkungsweise, die Entkopplung des bakteriellen Protonengradienten, nachzuweisen.

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war die Untersuchung des kanonischen Wnt-Signalwegs. Dieser Signalweg ist ein maßgeblicher Regulator von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen. Seine fehlerhafte Regulierung ist ein Auslöser der Tumorentwicklung; daher ist die Identifizierung von Inhibitoren des Signalwegs von großem klinischen Interesse. Aktivatoren des Wnt-Signalwegs werden andererseits bereits in der Stammzellforschung eingesetzt und sind deshalb ebenso von großer klinischer Relevanz. Durch Etablierung und Einsatz eines Luziferase-basierten Reporter-gen-Tests wurden insgesamt mehr als 800 chemische Substanzen auf ihre Eigenschaft, den kanonischen Wnt-Signalweg zu modulieren, untersucht.

Einer der aus dieser Analyse hervorgegangenen stärksten Inhibitoren, ein substituiertes Dekalin, wurde weitergehend untersucht. Nachdem die Dosis-Wirkungsuntersuchungen der Substanz in der Reporter-gen-Zelllinie und auch in untransformierten HEK293-Zellen die niedrig mikromolare Aktivität bestätigten, wurde genauer eingegrenzt, welcher Teil des Wnt-Signalwegs von der Substanz gestört wird. Dazu wurde der Proteinkomplex, welcher β -Catenin phosphoryliert, entweder durch niedermolekulare Verbindungen gehemmt oder es wurden für diesem Komplex defiziente Krebszelllinien für die Analyse genutzt. Da die Substanz auch in diesen Fällen ihre volle Wirksamkeit zeigte, wurde vermutet, dass das zelluläre Ziel in der Transskriptionskontrolle lag. Ein weiterer Hinweis wurde durch Inkubation der Substanz mit verschiedenen Zellfraktionen erhalten, die anschließend auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, den Wnt-Signalweg zu inhibieren. Es zeigte sich, dass die Verbindung nicht wirksam war, nachdem sie mit Proteinen des Zellkerns inkubiert wurde, wahrscheinlich weil ein Protein des Kerns die Substanz band und dadurch eine weitere Wirkung verhinderte. Eine Resynthese der Substanz gelang nicht, da die chemische Struktur der Verbindung nicht aufgeklärt werden konnte. Im Zuge dieser Strukturuntersuchung wurde, basierend auf 320 weiteren Dekalinen, eine Struktur-Wirkungsbeziehung aufgestellt, die zeigte, dass diese Substanzklasse durchaus noch weitere sehr aktive Verbindungen enthält.

Es wurde ebenso der Mechanismus der stärksten Aktivatoren untersucht, welche zur Klasse der Oxepane gehörten. Bei dieser Substanzklasse handelte es sich um synergistisch wirkende Substanzen, da sie ohne Aktivierung des Wnt-Signalwegs mit Wnt3a-Protein keine Wirkung zeigen. Studien mit niedermolekularen

Verbindungen oder Krebszelllinien zeigten, dass das molekulare Ziel der Aktivatoren auf der Ebene des Rezeptorkomplexes liegt. Deshalb wurde in Kooperation mit organischen Chemikern der Abteilung eine Affinitätssonde synthetisiert. Hierzu wurde im Vorfeld durch Untersuchung von 116 Oxepanen eine Struktur-Wirkungsbeziehung aufgestellt. Die durch eine Kooperation dargestellte Sonde wurde in einer Affinitätsaufreinigung eingesetzt, wodurch es gelang, neben anderen Proteinen die Vang-Gogh-Like-Proteine 1 und 2 als Bindepartner zu identifizieren. Diese Proteine sind Rezeptoren des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalwegs und können direkt den kanonischen Wnt-Signalweg beeinflussen. Die Proteine Cdc2 und Pesc1 konnten als spezifische Bindepartner ausgeschlossen werden. Vang1 hingegen konnte in anschließenden Immunodetektionen als reversibler Bindepartner identifiziert werden.

Die Charakterisierung von Proteinen der Van-Gogh-Like-Proteinfamilie als Bindepartner verschiedener Oxepanderivate bildet einen interessanten Einstieg in weiterführende Untersuchungen des kanonischen und des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs.

8. Anhang

8.1 Daten zur Struktur-Wirkungsbeziehung der Oxepan Bibliothek

Tabelle 8: Vollständige Daten zur Wnt-Aktivität und Toxizität der Oxepan Bibliothek. Die Messung der Wnt-Aktivität wurde in der Reporter-gen-Zelllinie nach der in Kapitel 4.2.8 dargestellten Methode durchgeführt. Die Toxizität der Verbindungen wurde in HEK293-Zellen nach Methode 4.2.5 bestimmt.

Substanz- name	Mol. ID.	Wnt- Aktivität bei 30 μ M	Wnt- Aktivität bei 20 μ M	Wnt- Aktivität bei 10 μ M	Viabilität bei 30 μ M	Viabilität bei 20 μ M	Viabilität bei 10 μ M
SB01	298774	188,4 \pm 20,4	191,4 \pm 36,2	203,6 \pm 7,2	97,8 \pm 9,1	77,9 \pm 9,8	103,1 \pm 8,9
SB02	298785	128,3 \pm 24,8	95,3 \pm 31,6	226,1 \pm 14,3	103,1 \pm 1,3	102,9 \pm 6,7	87,2 \pm 7,6
SB03	298796	138,6 \pm 10,6	140,3 \pm 6,6	180,2 \pm 30,9	85,1 \pm 4,3	90,6 \pm 2,5	93,8 \pm 3,4
SB04	298801	162,9 \pm 9,7	136,4 \pm 22,5	131,7 \pm 10,4	103,4 \pm 4,1	121,5 \pm 21,5	90,5 \pm 14,7
SB05	298802	119,6 \pm 15,9	176,3 \pm 47,0	180,8 \pm 24,4	91,4 \pm 25,4	116,1 \pm 17,2	122,4 \pm 6,6
SB06	298803	223,7 \pm 33,1	164,1 \pm 29,6	188,7 \pm 21,1	90,8 \pm 7,5	108,2 \pm 4,5	107,7 \pm 3,5
SB07	298804	139,7 \pm 10,6	107,6 \pm 20,6	120,5 \pm 11,3	131,7 \pm 7,4	126,8 \pm 3,5	120,8 \pm 11,2
SB08	298805	208,4 \pm 9,0	127,6 \pm 29,8	113,1 \pm 14,5	92,7 \pm 6,1	77,0 \pm 8,8	104,8 \pm 16,2
SB010	298775	122,6 \pm 11,0	132,4 \pm 27,3	135,6 \pm 24,2	61,7 \pm 5,3	79,9 \pm 6,7	86,6 \pm 8,7
SB011	298776	147,7 \pm 13,4	133,1 \pm 14,0	122,0 \pm 12,3	80,6 \pm 8,7	90,1 \pm 9,7	107,6 \pm 4,2

8. Anhang

SB012	298777	127,7 ±12,7	135,8 ±26,3	200,2 ±15,6	87,1 ±9,6	63,4 ±7,4	107,4 ±2,0
SB014	298779	130,6 ±11,3	100,3 ±9,7	117,1 ±7,1	96,0 ±4,2	98,3 ±9,9	85,3 ±9,9
SB015	298780	143,7 ±21,0	93,6 ±10,5	142,1 ±10,7	96,5 ±5,5	103,1 ±5,7	108,3 ±9,5
SB016	298781	145,3 ±5,8	136,3 ±10,7	118,4 ±14,9	107,2 ±6,5	101,6 ±9,5	102,5 ±7,0
SB017	298782	126,8 ±14,1	161,2 ±24,9	154,9 ±8,0	76,8 ±6,6	84,8 ±8,5	84,8 ±5,6
SB018	298783	145,1 ±7,3	75,6 ±13,8	113,8 ±22,9	73,0 ±3,4	77,5 ±6,7	90,3 ±10,9
SB019	298784	152,4 ±13,2	102,7 ±21,2	133,3 ±15,4	66,5 ±6,7	79,8 ±6,1	91,8 ±9,7
SB020	298786	147,3 ±10,6	116,1 ±14,4	115,6 ±11,2	59,0 ±4,9	118,5 ±9,3	74,3 ±2,4
SB021	298787	102,4 ±6,6	144,6 ±40,0	149,9 ±11,6	84,0 ±5,3	90,8 ±18,1	81,9 ±14,5
SB022	298788	113,5 ±12,1	136,0 ±29,4	150,4 ±12,8	59,7 ±7,5	69,2 ±3,9	80,9 ±6,3
SB023	298789	131,6 ±13,0	131,0 ±35,7	150,8 ±7,9	91,6 ±6,7	96,2 ±12,1	102,1 ±17,3
SB024	298790	113,0 ±12,0	79,3 ±7,4	130,6 ±10,3	113,1 ±4,0	104,4 ±4,5	91,0 ±15,2
SB025	298791	97,2 ±5,6	131,1 ±22,0	150,9 ±12,4	77,7 ±4,9	88,8 ±4,5	106,8 ±5,1
SB026	298792	124,4 ±15,4	137,7 ±33,8	181,2 ±12,3	120,4 ±9,9	121,7 ±10,6	108,7 ±8,9
SB027	298793	136,3 ±15,9	106,8 ±16,9	124,0 ±13,9	118,1 ±9,6	122,6 ±9,2	124,1 ±10,2
SB028	298794	82,5 ±40,4	86,8 ±17,2	120,2 ±6,8	111,4 ±7,7	120,5 ±7,3	129,9 ±9,8
SB029	298795	115,3	106,6	139,3	91,8	102,0	106,2

8. Anhang

		±6,2	±8,7	±7,5	±6,0	±11,4	±2,4
SB030	298797	137,8 ±27,8	136,8 ±8,7	104,7 ±14,1	78,3 ±12,3	65,1 ±3,0	85,6 ±8,9
SB031	298798	151,3 ±14,7	107,7 ±11,2	118,8 ±10,8	85,4 ±13,1	97,3 ±19,5	103,4 ±17,6
SB032	298799	97,0 ±16,7	145,1 ±32,9	130,9 ±5,5	89,7 ±5,2	91,5 ±6,0	89,4 ±8,7
SB033	298800	116,3 ±6,7	144,4 ±21,0	106,7 ±1,5	79,9 ±5,2	81,0 ±3,8	91,0 ±9,3
SB034	329229	118,1 ±15,6	138,9 ±9,3	76,6 ±25,6	94,2 ±6,0	91,6 ±5,5	100,9 ±7,7
SB035	329230	120,3 ±34,7	159,4 ±11,1	163,6 ±20,1	90,4 ±7,3	107,3 ±7,0	103,3 ±16,1
SB036	329231	83,9 ±22,2	140,3 ±12,5	129,5 ±0,8	107,3 ±8,5	87,7 ±10,2	111,0 ±8,3
SB037	329232	111,7 ±27,3	125,9 ±15,0	109,5 ±26,8	53,8 ±18,3	50,7 ±11,5	57,0 ±14,7
SB038	316346	104,2 ±35,9	108,5 ±10,0	136,2 ±9,9	50,3 ±13,1	59,8 ±8,0	65,8 ±13,1
SB039	316347	154,9 ±37,5	166,6 ±20,0	163,6 ±24,0	66,5 ±7,3	109,4 ±8,9	105,8 ±13,8
SB040	329233	131,9 ±16,5	161,5 ±12,8	136,4 ±6,8	91,5 ±7,1	95,1 ±5,2	114,3 ±18,8
SB041	316348	112,3 ±25,5	186,1 ±9,4	131,3 ±11,0	70,7 ±9,7	71,9 ±17,0	75,2 ±17,1
SB042	329234	126,5 ±43,6	186,8 ±14,3	124,9 ±11,6	84,6 ±6,2	94,7 ±13,4	101,0 ±13,7
SB043	329235	143,0 ±14,2	208,7 ±8,9	145,3 ±8,8	105,4 ±15,9	100,6 ±7,8	120,5 ±7,7
SB044	316349	57,0 ±4,9	158,7 ±14,0	142,5 ±5,9	101,0 ±5,5	124,3 ±21,1	131,2 ±6,1
SB045	316350	180,7 ±10,8	217,3 ±20,8	166,2 ±21,6	94,0 ±5,7	110,2 ±5,9	119,0 ±11,5

8. Anhang

SB046	316351	130,4 ±5,2	138,7 ±9,3	131,0 ±7,8	112,1 ±23,4	102,8 ±8,5	110,1 ±17,1
SB047	329236	99,0 ±2,2	158,0 ±21,9	148,4 ±12,2	99,9 ±23,2	98,7 ±27,9	130,7 ±28,2
SB048	329237	120,2 ±15,4	162,2 ±9,8	109,0 ±9,0	117,9 ±23,3	123,7 ±26,6	125,5 ±20,9
SB049	329238	143,3 ±16,1	168,4 ±20,4	155,0 ±26,8	116,0 ±24,9	115,7 ±23,8	125,8 ±26,6
SB050	329239	134,5 ±11,7	169,5 ±36,7	126,0 ±19,0	109,6 ±46,0	122,8 ±9,9	145,6 ±16,4
SB051	329240	130,7 ±8,7	156,6 ±13,6	101,5 ±14,2	138,2 ±24,7	120,6 ±27,3	125,9 ±28,7
SB052	329241	133,3 ±6,0	180,5 ±9,6	135,1 ±9,7	107,9 ±27,3	114,0 ±19,5	110,0 ±21,0
SB053	316352	129,4 ±11,2	145,7 ±25,0	121,6 ±3,9	110,3 ±26,7	105,8 ±28,3	108,0 ±31,5
SB054	316353	111,4 ±37,2	128,5 ±11,0	121,2 ±20,7	91,2 ±4,6	97,8 ±7,5	122,4 ±9,7
SB055	316354	122,1 ±11,8	146,5 ±10,3	113,4 ±5,6	117,2 ±6,2	126,6 ±13,2	133,6 ±14,4
SB056	316355	121,0 ±5,3	126,2 ±6,6	119,5 ±21,0	111,7 ±8,1	102,9 ±7,9	102,3 ±18,6
SB057	329242	109,5 ±19,2	167,7 ±13,0	85,3 ±3,5	71,2 ±11,7	77,6 ±10,7	88,5 ±22,5
SB058	329243	123,5 ±12,2	173,0 ±18,5	94,3 ±14,6	83,2 ±19,6	89,8 ±18,6	101,4 ±25,3
SB059	329244	116,8 ±12,3	153,1 ±8,5	123,0 ±5,3	79,2 ±6,3	76,6 ±20,7	80,4 ±9,9
SB060	329245	142,0 ±7,2	150,1 ±11,2	128,5 ±6,2	63,3 ±11,6	92,6 ±14,1	115,8 ±23,0
SB061	316356	161,8 ±13,3	161,5 ±16,4	105,9 ±22,3	111,0 ±27,1	113,7 ±19,0	107,7 ±25,9
SB062	329246	117,7	118,3	96,6	95,0	106,9	110,1

8. Anhang

		±3,1	±37,3	±5,9	±16,4	±12,3	±11,9
SB063	316357	154,8 ±7,8	229,4 ±42,4	126,3 ±15,0	84,9 ±10,0	83,6 ±9,1	96,2 ±16,0
SB064	316358	139,2 ±8,3	140,1 ±7,9	97,5 ±7,9	109,4 ±18,0	112,2 ±19,0	108,4 ±15,8
SB065	329247	112,8 ±5,4	136,6 ±29,9	108,0 ±3,2	110,0 ±24,0	112,2 ±17,4	118,4 ±22,5
SB066	329248	111,9 ±4,1	129,3 ±10,7	103,1 ±8,0	100,1 ±11,3	93,1 ±15,5	84,1 ±13,6
SB067	316359	128,0 ±8,6	168,8 ±29,2	102,7 ±11,1	48,9 ±21,3	62,2 ±13,1	67,3 ±11,2
SB068	316360	155,1 ±11,2	192,0 ±23,4	123,4 ±10,6	87,5 ±17,0	94,2 ±6,7	92,9 ±8,9
SB069	316361	115,9 ±12,8	167,1 ±33,8	118,8 ±17,0	83,7 ±16,3	105,3 ±37,9	158,0 ±87,4
SB070	329249	124,8 ±16,4	155,8 ±30,9	98,3 ±10,0	125,8 ±26,1	138,8 ±30,4	183,4 ±60,9
SB071	329250	122,8 ±9,7	120,1 ±39,3	97,2 ±20,2	95,0 ±20,2	80,3 ±10,7	92,1 ±12,3
SB072	316362	112,0 ±4,8	178,6 ±13,1	137,1 ±7,6	80,4 ±11,7	89,7 ±16,0	94,5 ±14,6
SB073	329251	111,1 ±14,8	138,3 ±14,3	149,5 ±11,6	83,3 ±9,0	91,6 ±9,2	93,5 ±11,0
SB074	329252	121,7 ±6,1	132,2 ±13,4	172,1 ±18,8	81,6 ±11,2	75,4 ±9,8	87,0 ±16,2
SB075	316363	48,8 ±7,7	135,4 ±16,4	112,1 ±5,3	152,2 ±46,0	113,3 ±4,4	114,4 ±12,5
SB076	316364	3,8 ±3	159,6 ±22,6	132,8 ±9,6	101,7 ±7,7	111,1 ±4,6	124,0 ±10,0
SB077	329253	106,8 ±23,0	157,2 ±9,1	112,3 ±6,7	99,6 ±12,6	111,3 ±13,6	112,9 ±5,4
SB078	329254	113,3 ±29,4	151,8 ±7,4	150,7 ±12,2	113,5 ±9,7	111,9 ±12,2	128,8 ±8,1

8. Anhang

SB079	316365	89,0 ±31,0	143,6 ±13,6	128,9 ±16,6	111,7 ±10,5	113,1 ±2,4	116,0 ±6,7
SB080	329255	86,4 ±21,9	190,1 ±20,4	150,8 ±21,6	93,9 ±28,1	105,4 ±7,4	121,4 ±9,5
SB081	316366	105,2 ±11,7	184,0 ±17,8	111,2 ±25,9	102,9 ±7,7	111,9 ±8,4	109,4 ±8,7
SB082	316367	61,3 ±3,8	159,2 ±19,9	114,8 ±14,4	121,8 ±7,8	121,1 ±15,9	126,4 ±16,0
SB083	329256	98,2 ±17,6	154,8 ±11,9	116,9 ±19,2	127,2 ±8,4	132,9 ±8,2	130,6 ±54,4
SB084	316368	71,5 ±2,4	173,7 ±1,2	85,4 ±7,6	112,0 ±44,0	134,3 ±47,1	140,0 ±58,8
SB085	329257	109,2 ±12	171,1 ±8,7	114,9 ±27,4	127,9 ±8,7	105,2 ±10,3	108,9 ±22,4
SB086	316369	79,1 ±14,4	149,8 ±19,3	77,6 ±19,8	114,7 ±11,8	112,8 ±7,5	112,1 ±6,7
SB087	329258	81,7 ±21,0	141,9 ±10,1	99,7 ±3,3	105,5 ±8,9	104,9 ±5,2	122,5 ±7,4
SB088	316370	86,7 ±36,8	137,7 ±16,2	121,7 ±19,0	114,7 ±1,7	113,3 ±6,2	121,4 ±20,6
SB089	329259	103,3 ±11,1	136,6 ±15,3	113,1 ±19,7	106,6 ±9,7	95,2 ±8,0	107,3 ±10,3
SB090	329260	130,3 ±16,0	187,2 ±10,0	126,0 ±21,1	98,2 ±8,7	134,4 ±28,5	171,5 ±47,0
SB091	316371	66,3 ±14,3	151,6 ±20,0	141,9 ±26,0	99,1 ±9,3	98,4 ±1,8	92,9 ±5,4
SB092	316372	152,0 ±15,1	136,4 ±10,5	122,4 ±17,2	74,1 ±5,0	86,0 ±2,5	98,6 ±7,5
SB093	329261	93,1 ±24,3	122,6 ±25,8	90,7 ±15,7	86,6 ±9,6	91,3 ±19,3	89,7 ±20,0
SB094	316373	96,5 ±14,1	171,8 ±22,2	96,0 ±4,8	147,4 ±25,2	151,7 ±54,2	121,4 ±16,8
SB095	316374	98,1	150,2	129,6	81,1	81,8	69,5

8. Anhang

		±10,5	±8,4	±11,7	±12,8	±7,9	±5,7
SB096	316375	143,9 ±41,7	144,4 ±14,9	115,4 ±7,8	106,4 ±18,6	95,4 ±2,8	89,2 ±8,3
SB097	316376	159,8 ±82,9	147,6 ±19,7	104,0 ±5,8	88,4 ±23,1	89,9 ±46,2	74,1 ±16,4
SB098	329262	129,9 ±42,4	172,8 ±9,2	140,9 ±22,0	100,3 ±24,1	115,0 ±18,7	90,4 ±13,6
SB099	329263	164,1 ±22,0	154,1 ±18,2	170,2 ±8,4	107,0 ±6,1	136,0 ±21,3	188,7 ±35,4
SB0100	329224	150,0 ±39,3	153,7 ±15,1	110,1 ±9,0	90,2 ±20,5	167,8 ±41,3	185,1 ±48,0
SB0101	329225	116,8 ±43,1	124,7 ±6,4	144,9 ±19,4	86,8 ±18,0	103,5 ±11,1	96,4 ±8,5
SB0102	329226	98,8 ±27,2	150,5 ±7,7	153,1 ±18,8	145,3 ±4,3	137,0 ±3,5	145,0 ±6,6
SB0103	329227	151,5 ±67,4	159,5 ±27,6	147,8 ±3,0	79,2 ±15,2	124,6 ±24,1	110,0 ±42,5
SB0104	316343	79,8 ±14,2	151,7 ±14,4	158,6 ±30,3	81,7 ±8,8	77,5 ±9,4	115,5 ±20,0
SB0105	316344	235,2 ±67,1	213,5 ±23,0	219,6 ±31,0	16,5 ±5,7	64,0 ±5,4	100,6 ±8,4
SB0106	316345	91,9 ±28,7	146,0 ±9,6	114,2 ±7,1	118,5 ±5,7	94,7 ±5,7	103,7 ±17,5
SB0107	329228	150,8 ±31,4	143,3 ±9,6	131,7 ±7,1	100,0 ±14,1	113,8 ±7,7	94,2 ±15,2

8.2 Vollständige Liste der identifizierten humanen Proteine

Tabelle 9: Identifizierte Proteine durch die Swiss-Prot Datenbank bei Einschränkung auf ausschließlich humane Proteine. Die Proteinnamen und Funktionen wurden aus der Swiss-Prot Datenbank (Version 57.14) extrahiert. Die Proteine Ddx41, Dhx35 und Rcd1 konnten bei einer Wahrscheinlichkeit von 1% 4-mal identifiziert werden. Alle anderen Proteine wurden jeweils 3-mal in den 5 Versuchen identifiziert.

Abkürzung	voller Proteinname	Funktion	Fehlerwahrscheinlichkeit
Ddx41	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	Wahrscheinliche Funktion in RNA Prozessierung	0,1% und 1%
Dpod3	DNA polymerase delta subunit 3	Teil der DNA Polymerase delta, Funktion in der DNA Reparatur	0,1% und 1%
H2ax	Histone H2	DNA Kondensation	0,1% und 1%
Rrp1	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog A	rRNA Reifung; Biogenese der 28S rRNA	0,1% und 1%
Ula1	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	Teil der Neddylierungskaskade der Zelle	0,1% und 1%
Acta	Alpha actin 2	Bestandteil des kontraktile Apparats in Muskelzellen	0,1%
AtpO	ATP synthase subunit O	Teil der mitochondrialen ATP Synthase. Stellt ATP bereit	0,1%
Sap18	Histone deacetylase complex subunit SAP18	Repressor der Transkription. Funktion in der mRNA Reifung	0,1%
Ssrd	Translocon-associated protein subunit delta	Integrales Membranprotein des ER, reguliert die Kalzium Homöostase der Zelle.	0,1%

8. Anhang

Tbrg4	Transforming growth factor beta regulator 4	Funktion in der Induktion der Apoptose	0,1%
Tmm33	Transmembrane protein 33	Transmembranprotein unbekannter Funktion.	0,1%
1B07	HLA class I histocompatibility antigen	Teil der Familie der MHC-Klasse-I-Proteine der Immunsystems	1%
AbcF1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	Teil der Translationsmaschinerie	1%
Cdk5	Cell division protein kinase 5	Zellzykluskontrollkinase; aktiviert durch G1 Zykline	1%
Cdk9	Cell division protein kinase 9	Aktiviert durch cyclin-T1; Teil des P-TEFb Komplexes	1%
Cog1	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1	Funktion bei der Golgi Morphologie und Lokalisation	1%
Cul2	Cullin-2	Bestandteil der E3-Ligase; Aktiviert durch Neddylierung	1%
Dhx35	probable ATP-dependent RNA helicase DHX35	Möglicherweise involviert in die mRNA Reifung	1%
Drs7B	Dehydrogenase / reductase SDR family member 7b	Vorhergesagte Dehydrogenase mit breitem Substratspektrum	1%
Ei2bg	Translation initiation factor eIF-2B subunit γ	Nukleotid Austauschfaktor von eIF2	1%
Lypa2	Acyl-protein thioesterase 2	hydrolysiert gebundene Palmitatreste	1%
Nduba	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	Teil des Atmungskettenkomplexes I	1%
Odb2	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-	Mitochondriales Enzym; wandelt alpha-keto Säuren in acetyl-CoA und CO ₂ um	1%

8. Anhang

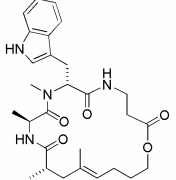
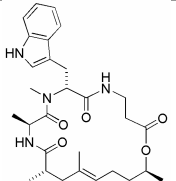
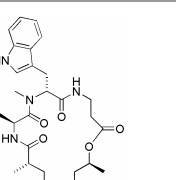
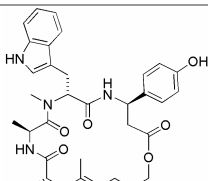
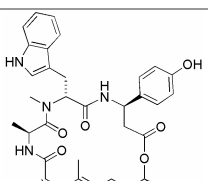
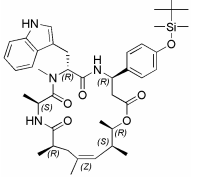
	keto acid dehydrogenase complex		
Osgep	Probable O-sialoglycoprotein endopeptidase	spaltet membranständige Glycoproteine	1%
Psd10	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	Regulatorische Untereinheit des 26S Proteasoms	1%
Rcd1	Cell differentiation protein RCD1 homolog	Repressor von MYB und JUN abhängigen Genen	1%
Rfc3	Replication factor C subunit 3	Teil der DNA Reparatur	1%
Ring2	E3 ubiquitin-protein ligase RING2	Ubiquitinligase; mono-ubiquitinyliert Histon 2A	1%
Rl37	60S ribosomal protein L37	Teil des Ribosoms; bindet 23S rRNA	1%
Rs12	40S ribosomal protein S12	Teil der ribosomalen Proteinfamilie S12e	1%
Ru17	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	Funktion in der mRNA Reifung	1%
Sfrs5	Splicing factor, arginine/serine-rich 5	Funktion in der mRNA Reifung;	1%
Tarb1	Probable methyltransferase TARB1	Möglicherweise eine SAM abhängige RNA Methyltransferase	1%
Ube2S	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S	Ubiquitinligase; Regulator der Mitose	1%
Ufsp2	Ufm1-specific protease 2	Thiol protease von Ufm1	1%
Usp9Y	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y	Teil der TGF-beta/BMP-Signalwegs; deubiquitinyliert SMAD4	1%

8. Anhang

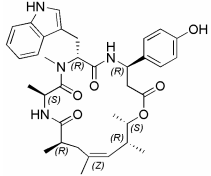
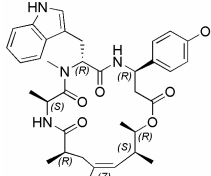
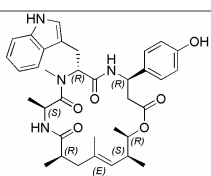
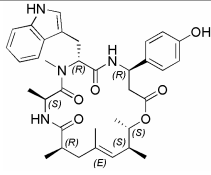
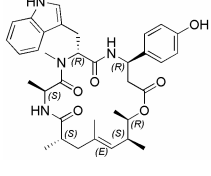
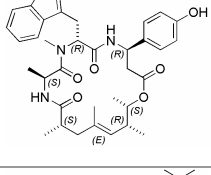
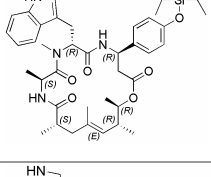
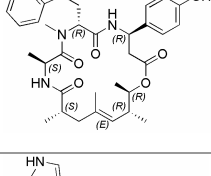
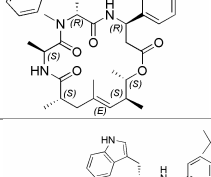
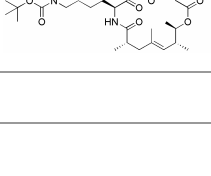
Vac14	Protein VAC14 homolog	Reguliert den PI(3,5)P2-Signalweg	1%
Vang2	VANG-like protein2	Rezeptor des Wnt/PCP-Signalwegs;	1%
Vav2	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	GEF für Rho; wichtig für Angiogenese	1%
Vps18	Vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog	Funktion beim Transport von Lysosomen und deren Fusion mit späten Endosomen	1%
Vps41	Vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog	Notwendig für die Bildung von Vacuolen und deren Transport	1%
Vps53	Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog	Möglicherweise wichtig für den retrograden Transport früher und später Endosomen zum Golgi	1%
Wdr18	WD repeat-containing protein 18	Funktion ungeklärt	1%
Wdr26	WD repeat-containing protein 26	Interagiert mit DDB1-CUL4A/B E3 Ligase Komplex; Teil des MAPK-Signalwegs	1%
Wdr5	WD repeat-containing protein 5	Teil des Proteinkomplexes für Histon3 Methylierung	1%
Yi016	Putative tubulin beta chain-like protein	Möglicherweise ein Mitglied der Tubulin Proteinfamilie	1%
Zer1	Zer-1 homolog	Teil des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes	1%
Zy11B	Zyg-11 homolog B	Teil des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes	1%

8.3 Vollständige Liste der Zytotoxizitätsdaten der Chondramid und Jaspamid ähnlichen Verbindungen

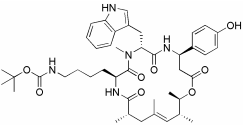
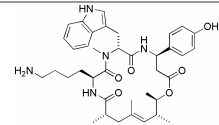
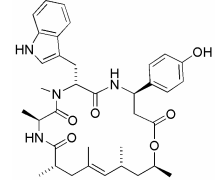
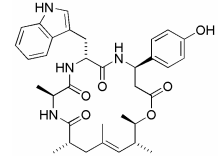
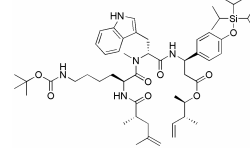
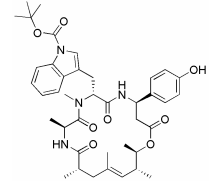
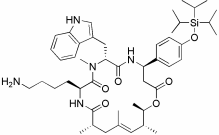
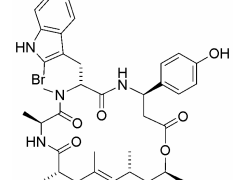
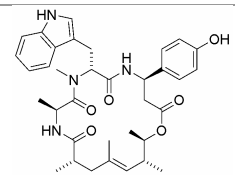
Tabelle 10: Messung der Zytotoxizität verschiedener Chondramid und Jaspamid ähnlicher Verbindungen. Die Viabilität wurde mittels des WST Tests gemessen. Die Daten sind normalisiert indem die Positivkontrolle auf 100% und der Leerwert auf 0% gesetzt wurden. Die angegebenen IC₅₀-Werte sind Mittelwerte aus zwei unterschiedlichen Messungen. Die für Chondramid und Jaspamid ermittelten IC₅₀-Werte stimmen mit Literaturdaten überein.[192,193]

Name	Chemische Struktur	IC ₅₀ -Werte HT29 Zellen in nM	IC ₅₀ -Werte MCF7 Zellen in nM
LGM154		>15.000	>15.000
LGM156		>15.000	>15.000
LGM158		>15.000	>15.000
LGM162		168,4 ±39,3	84,5 ±10,3
LGM163		26,4 ±1,3	40,1 ±2,6
Hu2-31P1		>15.000	10.237,1 ±622

8. Anhang

Hu2-35		6.191,8 ±1.166	6.852,5 ±1098,1
Hu2-37		3.709,9 ±824,6	3.170,7 ±492,2
Hu2-39		>15.000	>15.000
Hu2-57		>15.000	>15.000
Hu2-83		312,6 ±28,2	337,1 ±89,4
Hu2-89		702,6 ±50,2	386,8 ±32,5
Hu2-95		2.636,7 ±522,9	2.325,6 ±249
Hu2-97		30,7 ±1	82,5 ±4
Hu2-101		283,9 ±12	212,1 ±16,3
LGM127a		>15.000	>15.000

8. Anhang

LGM128a		$28 \pm 1,4$	$36,9 \pm 5,5$
LGM143a		>10.000	>10.000
RT189a		$11,2 \pm 0,4$	$22,5 \pm 0,9$
RT201a/RT20/4		$191,1 \pm 9,6$	$222,3 \pm 17,3$
LGM115/LGM117		>15.000	>15.000
LGM139a		$254,9 \pm 18,3$	$267 \pm 28,4$
LGM142a		>10.000	>10.000
Jaspamid		$21,1 \pm 1$	$25,3 \pm 4$
Chondramid C		$21,1 \pm 1,2$	$22,9 \pm 2,1$

9. Literaturverzeichnis

1. Morrison KL, Weiss GA: **The origins of chemical biology.** *Nat Chem Biol* 2006, **2**:3-6.
2. Dearden JC: **Partitioning and lipophilicity in quantitative structure-activity relationships.** *Environ Health Perspect* 1985, **61**:203-228.
3. Ferguson J: **The use of chemical potentials as indices of toxicity.** *Proceedings of the Royal Society of London / B* 1939, **127**:387-404.
4. Balaz S: **Lipophilicity in trans-bilayer transport and subcellular pharmacokinetics.** *Perspectives in Drug Discovery and Design* 2000, **19**:157-177.
5. Thorner DA, Willett P, Wright PM, Taylor R: **Similarity searching in files of three-dimensional chemical structures: representation and searching of molecular electrostatic potentials using field-graphs.** *J Comput Aided Mol Des* 1997, **11**:163-174.
6. Pepperrell CA, Willett P: **Techniques for the calculation of three-dimensional structural similarity using inter-atomic distances.** *J Comput Aided Mol Des* 1991, **5**:455-474.
7. Dagliyan O, Kavakli IH, Turkey M: **Classification of cytochrome P450 inhibitors with respect to binding free energy and pIC50 using common molecular descriptors.** *J Chem Inf Model* 2009, **49**:2403-2411.
8. Davis AM, Riley RJ: **Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities.** *Curr Opin Chem Biol* 2004, **8**:378-386.
9. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **46**:3-26.
10. Terstappen GC, Schlupen C, Raggiaschi R, Gaviraghi G: **Target deconvolution strategies in drug discovery.** *Nat Rev Drug Discov* 2007, **6**:891-903.
11. Yamamoto K, Yamazaki A, Takeuchi M, Tanaka A: **A versatile method of identifying specific binding proteins on affinity resins.** *Anal Biochem* 2006, **352**:15-23.
12. Swaney DL, Wenger CD, Coon JJ: **Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics.** *J Proteome Res* **9**:1323-1329.
13. Wang B, Malik R, Nigg EA, Korner R: **Evaluation of the low-specificity protease elastase for large-scale phosphoproteome analysis.** *Anal Chem* 2008, **80**:9526-9533.
14. Zhu W, Smith JW, Huang CM: **Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics.** *J Biomed Biotechnol* **2010**:840518.
15. Ong SE, Mann M: **A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC).** *Nat Protoc* 2006, **1**:2650-2660.
16. Ong SE, Mann M: **Identifying and quantifying sites of protein methylation by heavy methyl SILAC.** *Curr Protoc Protein Sci* 2006, **Chapter 14**:Unit 14 19.
17. Sharma K, Weber C, Bairlein M, Greff Z, Keri G, Cox J, Olsen JV, Daub H: **Proteomics strategy for quantitative protein interaction profiling in cell extracts.** *Nat Methods* 2009, **6**:741-744.

18. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R: **Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.** *Nat Biotechnol* 1999, **17**:994-999.
19. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, et al.: **Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**:1154-1169.
20. Choe L, D'Ascenzo M, Relkin NR, Pappin D, Ross P, Williamson B, Guertin S, Pribil P, Lee KH: **8-plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease.** *Proteomics* 2007, **7**:3651-3660.
21. Phanstiel D, Unwin R, McAlister GC, Coon JJ: **Peptide quantification using 8-plex isobaric tags and electron transfer dissociation tandem mass spectrometry.** *Anal Chem* 2009, **81**:1693-1698.
22. Van Damme P, Van Damme J, Demol H, Staes A, Vandekerckhove J, Gevaert K: **A review of COFRADIC techniques targeting protein N-terminal acetylation.** *BMC Proc* 2009, **3 Suppl 6**:S6.
23. Giaever G, Flaherty P, Kumm J, Proctor M, Nislow C, Jaramillo DF, Chu AM, Jordan MI, Arkin AP, Davis RW: **Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:793-798.
24. Butcher RA, Bhullar BS, Perlstein EO, Marsischky G, LaBaer J, Schreiber SL: **Microarray-based method for monitoring yeast overexpression strains reveals small-molecule targets in TOR pathway.** *Nat Chem Biol* 2006, **2**:103-109.
25. Hart CP: **Finding the target after screening the phenotype.** *Drug Discov Today* 2005, **10**:513-519.
26. Zheng XS, Chan TF, Zhou HH: **Genetic and genomic approaches to identify and study the targets of bioactive small molecules.** *Chem Biol* 2004, **11**:609-618.
27. Licitra EJ, Liu JO: **A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:12817-12821.
28. King RW: **Chemistry or biology: which comes first after the genome is sequenced?** *Chem Biol* 1999, **6**:R327-333.
29. Spring DR: **Chemical genetics to chemical genomics: small molecules offer big insights.** *Chem Soc Rev* 2005, **34**:472-482.
30. Hubel K, Lessmann T, Waldmann H: **Chemical biology--identification of small molecule modulators of cellular activity by natural product inspired synthesis.** *Chem Soc Rev* 2008, **37**:1361-1374.
31. Florian S, Hummer S, Catarinella M, Mayer TU: **Chemical genetics: reshaping biology through chemistry.** *HFSP J* 2007, **1**:104-114.
32. Herbert Waldmann PJ: **Chemical Biology Learning through Case Studies.** Edited by: Wiley-VCH; 2009.
33. Weinberg RA: *The Biology of Cancer*: Garland Science; 2007.
34. Sassetti CM, Rubin EJ: **The open book of infectious diseases.** *Nat Med* 2007, **13**:279-280.
35. Fischbach MA, Walsh CT: **Antibiotics for emerging pathogens.** *Science* 2009, **325**:1089-1093.

36. Nathan C, Goldberg FM: **Outlook: the profit problem in antibiotic R&D.** *Nat Rev Drug Discov* 2005, **4**:887-891.
37. Carmeli Y, Troillet N, Karchmer AW, Samore MH: **Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Arch Intern Med* 1999, **159**:1127-1132.
38. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH: **Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:1379-1382.
39. Dibner JJ, Richards JD: **Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action.** *Poult Sci* 2005, **84**:634-643.
40. van den Bogaard AE, Bruinsma N, Stobberingh EE: **The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands.** *J Antimicrob Chemother* 2000, **46**:146-148.
41. van den Braak N, van Belkum A, van Keulen M, Vliegenthart J, Verbrugh HA, Endtz HP: **Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in The Netherlands.** *J Clin Microbiol* 1998, **36**:1927-1932.
42. Stobberingh E, van den Bogaard A, London N, Driessen C, Top J, Willems R: **Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans?** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:2215-2221.
43. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, et al.: **Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene.** *N Engl J Med* 2003, **348**:1342-1347.
44. Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark on World Wide Web URL: <http://www.who.int/salmsurv/links/gssamrgrowthreportstory/en/> (Besucht im Mai 2010)
45. Van Immerseel F, Methner U, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, Barrow PA: **Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity.** *Epidemiol Infect* 2005, **133**:959-978.
46. The World Fact Book on World Wide Web URL: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/> (Besucht im Mai 2010)
47. Hart CA, Kariuki S: **Antimicrobial resistance in developing countries.** *BMJ* 1998, **317**:647-650.
48. Randrianirina F, Soares JL, Carod JF, Ratsima E, Thonnier V, Combe P, Grosjean P, Talarmin A: **Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in Antananarivo, Madagascar.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**:309-312.
49. Blomberg B, Mwakagile DS, Urassa WK, Maselle SY, Mashurano M, Digranes A, Harthug S, Langeland N: **Surveillance of antimicrobial resistance at a tertiary hospital in Tanzania.** *BMC Public Health* 2004, **4**:45.

50. Jain A, Dixit P: **Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next?** *J Biosci* 2008, **33**:605-616.
51. Onyebujoh P, Zumla A, Ribeiro I, Rustomjee R, Mwaba P, Gomes M, Grange JM: **Treatment of tuberculosis: present status and future prospects.** *Bull World Health Organ* 2005, **83**:857-865.
52. Koenig R: **Drug-resistant tuberculosis. In South Africa, XDR TB and HIV prove a deadly combination.** *Science* 2008, **319**:894-897.
53. Cohen J: **Infectious disease. Extensively drug-resistant TB gets foothold in South Africa.** *Science* 2006, **313**:1554.
54. Rivers EC, Mancera RL: **New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action.** *Drug Discov Today* 2008, **13**:1090-1098.
55. Extance A: **Biologics target bad bugs.** *Nat Rev Drug Discov* **9**:177-178.
56. Stanley SM: *Historische Geologie*: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin; 2001.
57. Chen JY, Oliveri P, Gao F, Dornbos SQ, Li CW, Bottjer DJ, Davidson EH: **Precambrian animal life: Probable developmental and adult cnidarian forms from Southwest china.** *Developmental Biology* 2002, **248**:182-196.
58. Holstein TW: **Wnt signaling in cnidarians.** *Methods Mol Biol* 2008, **469**:47-54.
59. Bradley RS, Brown AM: **A soluble form of Wnt-1 protein with mitogenic activity on mammary epithelial cells.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:4616-4622.
60. Guder C, Philipp I, Lengfeld T, Watanabe H, Hobmayer B, Holstein TW: **The Wnt code: cnidarians signal the way.** *Oncogene* 2006, **25**:7450-7460.
61. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R: **Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors.** *Nature* 2003, **423**:448-452.
62. Mikels AJ, Nusse R: **Wnts as ligands: processing, secretion and reception.** *Oncogene* 2006, **25**:7461-7468.
63. Boutros M, Mihaly J, Bouwmeester T, Mlodzik M: **Signaling specificity by Frizzled receptors in Drosophila.** *Science* 2000, **288**:1825-1828.
64. Wang HY, Liu T, Malbon CC: **Structure-function analysis of Frizzleds.** *Cell Signal* 2006, **18**:934-941.
65. Kemp CR, Willems E, Wawrzak D, Hendrickx M, Agbor Agbor T, Leyns L: **Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling.** *Dev Dyn* 2007, **236**:2011-2019.
66. Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I: **Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses.** *Nat Neurosci* 2009, **12**:1567-1576.
67. Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST: **Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling.** *J Biol Chem* 2008, **283**:9359-9368.
68. Speese SD, Budnik V: **Wnts: up-and-coming at the synapse.** *Trends Neurosci* 2007, **30**:268-275.
69. Umbhauer M, Djiane A, Goisset C, Penzo-Mendez A, Riou JF, Boucaut JC, Shi DL: **The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling.** *EMBO J* 2000, **19**:4944-4954.

70. Chen M, Philipp M, Wang J, Premont RT, Garrison TR, Caron MG, Lefkowitz RJ, Chen W: **G Protein-coupled receptor kinases phosphorylate LRP6 in the Wnt pathway.** *J Biol Chem* 2009, **284**:35040-35048.
71. Caricasole A, Ferraro T, Iacovelli L, Barletta E, Caruso A, Melchiorri D, Terstappen GC, Nicoletti F: **Functional characterization of WNT7A signaling in PC12 cells: interaction with A FZD5 x LRP6 receptor complex and modulation by Dickkopf proteins.** *J Biol Chem* 2003, **278**:37024-37031.
72. Bejsovec A: **Flying at the head of the pack: Wnt biology in Drosophila.** *Oncogene* 2006, **25**:7442-7449.
73. Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, Butler PJ, Kikuchi A, Higuchi Y, Bienz M: **The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization.** *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**:484-492.
74. Gao C, Chen YG: **Dishevelled: The hub of Wnt signaling.** *Cell Signal* **22**:717-727.
75. Wharton KA, Jr.: **Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction.** *Dev Biol* 2003, **253**:1-17.
76. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A: **Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways.** *Trends Cell Biol* 2009, **19**:119-129.
77. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I: **Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway.** *Genes Dev* 2002, **16**:1066-1076.
78. Coombs GS, Covey TM, Virshup DM: **Wnt signaling in development, disease and translational medicine.** *Curr Drug Targets* 2008, **9**:513-531.
79. Hendriksen J, Jansen M, Brown CM, van der Velde H, van Ham M, Galjart N, Offerhaus GJ, Fagotto F, Fornerod M: **Plasma membrane recruitment of dephosphorylated beta-catenin upon activation of the Wnt pathway.** *J Cell Sci* 2008, **121**:1793-1802.
80. Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML: **Diversity of LEF/TCF action in development and disease.** *Oncogene* 2006, **25**:7492-7504.
81. Hoverter NP, Waterman ML: **A Wnt-fall for gene regulation: repression.** *Sci Signal* 2008, **1**:pe43.
82. Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT: **The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape.** *Trends Genet* 2000, **16**:279-283.
83. Malbon CC, Wang H, Moon RT: **Wnt signaling and heterotrimeric G-proteins: strange bedfellows or a classic romance?** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **287**:589-593.
84. Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP: **Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**:6278-6286.
85. Du SJ, Purcell SM, Christian JL, McGrew LL, Moon RT: **Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in Xenopus embryos.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:2625-2634.
86. Mikels AJ, Nusse R: **Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context.** *PLoS Biol* 2006, **4**:e115.

87. Kohn AD, Moon RT: **Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways.** *Cell Calcium* 2005, **38**:439-446.
88. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, Shibuya H, Moon RT, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K: **The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:131-139.
89. Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y: **Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation.** *J Cell Biol* 2003, **162**:899-908.
90. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT: **Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling.** *Nature* 1997, **390**:410-413.
91. Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT: **Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner.** *Curr Biol* 1999, **9**:695-698.
92. Krauss G: *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, vol 3rd Edition edn 3rd Edition: Wiley-VCH Verlag; 2003.
93. Kuhl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT: **Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in Xenopus.** *J Biol Chem* 2000, **275**:12701-12711.
94. Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K: **The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos.** *Nature* 2002, **417**:295-299.
95. Habas R, Kato Y, He X: **Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1.** *Cell* 2001, **107**:843-854.
96. Tu X, Joeng KS, Nakayama KI, Nakayama K, Rajagopal J, Carroll TJ, McMahon AP, Long F: **Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation.** *Dev Cell* 2007, **12**:113-127.
97. Tada M, Kai M: **Noncanonical Wnt/PCP signaling during vertebrate gastrulation.** *Zebrafish* 2009, **6**:29-40.
98. Karner C, Wharton KA, Jr., Carroll TJ: **Planar cell polarity and vertebrate organogenesis.** *Semin Cell Dev Biol* 2006, **17**:194-203.
99. Peng X, Grosse B, Le Tiec B, Nicolas V, Delagebeaudeuf C, Bedda T, Decaens C, Cassio D: **How to induce non-polarized cells of hepatic origin to express typical hepatocyte polarity: generation of new highly polarized cell models with developed and functional bile canaliculi.** *Cell Tissue Res* 2006, **323**:233-243.
100. Usui T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Burgess RW, Schwarz TL, Takeichi M, Uemura T: **Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled.** *Cell* 1999, **98**:585-595.
101. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT: **A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling.** *Dev Cell* 2003, **5**:367-377.
102. Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N: **Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the**

- planar cell polarity and Wingless signaling pathways.** *Genes Dev* 1998, **12**:2610-2622.
103. Bastock R, Strutt H, Strutt D: **Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during Drosophila planar polarity patterning.** *Development* 2003, **130**:3007-3014.
104. Tree DR, Shulman JM, Rousset R, Scott MP, Gubb D, Axelrod JD: **Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling.** *Cell* 2002, **109**:371-381.
105. Jenny A, Reynolds-Kenneally J, Das G, Burnett M, Mlodzik M: **Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding.** *Nat Cell Biol* 2005, **7**:691-697.
106. Rawls AS, Wolff T: **Strabismus requires Flamingo and Prickle function to regulate tissue polarity in the Drosophila eye.** *Development* 2003, **130**:1877-1887.
107. Klein TJ, Mlodzik M: **Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, **21**:155-176.
108. Das G, Reynolds-Kenneally J, Mlodzik M: **The atypical cadherin Flamingo links Frizzled and Notch signaling in planar polarity establishment in the Drosophila eye.** *Dev Cell* 2002, **2**:655-666.
109. Chen WS, Antic D, Matis M, Logan CY, Povelones M, Anderson GA, Nusse R, Axelrod JD: **Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling.** *Cell* 2008, **133**:1093-1105.
110. Strutt H, Strutt D: **Differential stability of flamingo protein complexes underlies the establishment of planar polarity.** *Curr Biol* 2008, **18**:1555-1564.
111. Lawrence PA, Struhl G, Casal J: **Planar cell polarity: one or two pathways?** *Nat Rev Genet* 2007, **8**:555-563.
112. Barrow JR: **Wnt/PCP signaling: a veritable polar star in establishing patterns of polarity in embryonic tissues.** *Semin Cell Dev Biol* 2006, **17**:185-193.
113. Lawrence PA, Struhl G, Casal J: **Do the protocadherins Fat and Dachous link up to determine both planar cell polarity and the dimensions of organs?** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:1379-1382.
114. Ma D, Yang CH, McNeill H, Simon MA, Axelrod JD: **Fidelity in planar cell polarity signalling.** *Nature* 2003, **421**:543-547.
115. Yang CH, Axelrod JD, Simon MA: **Regulation of Frizzled by fat-like cadherins during planar polarity signaling in the Drosophila compound eye.** *Cell* 2002, **108**:675-688.
116. Ishikawa HO, Takeuchi H, Haltiwanger RS, Irvine KD: **Four-jointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains.** *Science* 2008, **321**:401-404.
117. Simon MA, Xu A, Ishikawa HO, Irvine KD: **Modulation of Fat:Dachous Binding by the Cadherin Domain Kinase Four-Jointed.** *Curr Biol*.
118. Pan D: **Hippo signaling in organ size control.** *Genes Dev* 2007, **21**:886-897.
119. Park S, Gwak J, Cho M, Song T, Won J, Kim DE, Shin JG, Oh S: **Hexachlorophene inhibits Wnt/beta-catenin pathway by promoting Siah-mediated beta-catenin degradation.** *Mol Pharmacol* 2006, **70**:960-966.

120. Syn CK, Swarup S: **A scalable protocol for the isolation of large-sized genomic DNA within an hour from several bacteria.** *Anal Biochem* 2000, **278**:86-90.
121. Joseph Sambrook DR: *Molecular cloning: a laboratory manual*, vol 2: CSHL Press; 1998.
122. Breeuwer P, Drocourt J, Rombouts FM, Abee T: **A Novel Method for Continuous Determination of the Intracellular pH in Bacteria with the Internally Conjugated Fluorescent Probe 5 (and 6)-Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester.** *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**:178-183.
123. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
124. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
125. **Pipeline Pilot, a workflow tool.** Edited by: Accelrys.
126. Clark RD: **OptiSim: An Extended Dissimilarity Selection Method for Finding Diverse Representative Subsets.** *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 1997, **37**:1181-1188.
127. WHO: **The top 10 causes of death.** In *Fact Sheet 310*. Edited by: WHO; 2008.
128. Nussbaum Fv, Brands M, Hinzen B, Weigand S, Häbich D: **Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry - Exodus or Revival?** *Angew Chem Int Ed* 2006, **45**:5072-5129.
129. Singh SB, Phillips JW, Wang J: **Highly sensitive target-based whole-cell antibacterial discovery strategy by antisense RNA silencing.** *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 2007, **10**:160-166.
130. Hussar DA: **New drugs: Tigecycline, ziconotide, and clofarabine.** *Journal of the American Pharmacists Association* 2005, **45**:636-639.
131. Daum RS, Kar S, Kirkpatrick P: **Retapamulin.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2007, **6**:865-866.
132. Corey GR, Stryjewski ME, Weyenberg W, Yasothan U, Kirkpatrick P: **Telavancin.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2009, **8**:929-930.
133. Demain AL: **From natural products discovery to commercialization: a success story.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006, **33**:486-495.
134. Andrews JM: **The development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing.** *J Antimicrob Chemother* 2001, **48 Suppl 1**:29-42.
135. Stock I MK, Rodloff A, Wiedemann B: **Qualitätssicherung und Qualitätskontrollen in der Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung von Bakterien mit Hilfe der Mikrodilution.** *Chemother J* 2001, **10**:78-98.
136. Huang MB, Gay TE, Baker CN, Banerjee SN, Tenover FC: **Two percent sodium chloride is required for susceptibility testing of staphylococci with oxacillin when using agar-based dilution methods.** *J Clin Microbiol* 1993, **31**:2683-2688.
137. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR: **A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays.** *J Biomol Screen* 1999, **4**:67-73.
138. Crawford K, Heatley NG, Boyd PF, Hale CW, Kelley BK, Miller GA, Smith N: **Antibiotic production by a species of Cephalosporium.** *J Gen Microbiol* 1952, **6**:47-59.

139. Newton GG, Abraham EP: **Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-alpha-aminoadipic acid.** *Nature* 1955, **175**:548.
140. Zweerink MM, Edison A: **Inhibition of *Micrococcus luteus* DNA gyrase by norfloxacin and 10 other quinolone carboxylic acids.** *Antimicrob Agents Chemother* 1986, **29**:598-601.
141. Foster TJ: **Immune evasion by staphylococci.** *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**:948-958.
142. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Jr., Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG: **Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America.** *Clin Infect Dis* 2006, **42**:657-668.
143. Ganzle MG, Holtzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP: **Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:4325-4333.
144. Ganzle MG, Vogel RF: **Studies on the mode of action of reutericyclin.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:1305-1307.
145. Klaus A, Birchmeier W: **Wnt signalling and its impact on development and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**:387-398.
146. Sharma RP, Chopra VL: **Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*.** *Dev Biol* 1976, **48**:461-465.
147. Nusse R, Varmus HE: **Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome.** *Cell* 1982, **31**:99-109.
148. Brown AM, Wildin RS, Prendergast TJ, Varmus HE: **A retrovirus vector expressing the putative mammary oncogene *int-1* causes partial transformation of a mammary epithelial cell line.** *Cell* 1986, **46**:1001-1009.
149. Vaidya AB, Lasfargues EY, Sheffield JB, Coutinho WG: **Murine mammary tumor virus (MuMTV) infection of an epithelial cell line established from C57BL/6 mouse mammary glands.** *Virology* 1978, **90**:12-22.
150. Schorl C, Sedivy JM: **Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells.** *Methods* 2007, **41**:143-150.
151. Hexdall L, Zheng CF: **Stable luciferase reporter cell lines for signal transduction pathway readout using GAL4 fusion transactivators.** *Biotechniques* 2001, **30**:1134-1138, 1140.
152. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, et al.: **Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of *conductin/axin2* in colorectal and liver tumors.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:1184-1193.
153. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H: **Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma.** *Science* 1997, **275**:1784-1787.
154. Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT: **Zebrafish *prickle*, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements.** *Curr Biol* 2003, **13**:680-685.
155. The Wnt Homepage on World Wide Web URL: <http://www.stanford.edu/~rnusse/assays/reporter.html> (Besucht im Mai 2010)

156. Sussman DJ: **LEF/TCF-dependent, fluorescence-based reporter gene assay for Wnt signaling.** *Biotechniques* 2002, **32**:1000, 1002.
157. Menninger S: **Etablierung zellulärer Testsysteme zur Identifikation von Molekülsonden für chemisch-genetische Untersuchungen.** Doktorarbeit. TU Dortmund: 2009.
158. Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW, Shivdasani RA: **Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex.** *Cancer Cell* 2004, **5**:91-102.
159. Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VM, Klein PS: **Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action.** *Dev Biol* 1997, **185**:82-91.
160. Bordonaro M, Lazarova DL, Augenlicht LH, Sartorelli AC: **Cell type- and promoter-dependent modulation of the Wnt signaling pathway by sodium butyrate.** *Int J Cancer* 2002, **97**:42-51.
161. Chop AM, Abraham CL, Adrian TE, Murphy R, Boman BM: **Immunodetection of the presence or absence of full-length APC gene product in human colonic tissues.** *Anticancer Res* 1995, **15**:991-997.
162. Henderson BR, Fagotto F: **The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport.** *EMBO Rep* 2002, **3**:834-839.
163. Cohen P, Goedert M: **GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential.** *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**:479-487.
164. Pendzialek D: **Untersuchungen zur Rolle von Acyl Protein Thioesterase (APT1) bei der Acylierung von Ras-Isoformen.** Doktorarbeit. TU Dortmund: 2007.
165. Knoth T: **Synthese einer Kollektion von 3-Acyltetramsäuren und Identifizierung der Zielproteine von Melophrin A.** Doktorarbeit. TU Dortmund: 2009.
166. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.** *Science* 1995, **270**:467-470.
167. Weinrich D, Kohn M, Jonkheijm P, Westerlind U, Dehmelt L, Engelkamp H, Christianen PC, Kuhlmann J, Maan JC, Nusse D, et al.: **Preparation of biomolecule microstructures and microarrays by thiol-ene photoimmobilization.** *ChemBiochem* **11**:235-247.
168. Shi H, Liu K, Xu A, Yao SQ: **Small molecule microarray-facilitated screening of affinity-based probes (AfBPs) for gamma-secretase.** *Chem Commun (Camb)* 2009:5030-5032.
169. Kunz M, Ibrahim SM: **Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity.** *Mediators Inflamm* 2009, **2009**:979258.
170. Wilson DS, Nock S: **Functional protein microarrays.** *Current Opinion in Chemical Biology* 2002, **6**:81-85.
171. Wilson DS, Nock S: **Recent developments in protein microarray technology.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2003, **42**:494-500.
172. Niemeyer CM: **Self-assembled bioconjugates for biochip technologies.** *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2005, **85**:639-643.

173. Hautanen A, Gailit J, Mann DM, Ruoslahti E: **Effects of Modifications of the Rgd Sequence and Its Context on Recognition by the Fibronectin Receptor.** *Journal of Biological Chemistry* 1989, **264**:1437-1442.
174. Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, Blummel J, Eck W, Kantelehner M, Kessler H, Spatz JP: **Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces.** *Chemphyschem* 2004, **5**:383-388.
175. Kato M, Mrksich M: **Using model substrates to study the dependence of focal adhesion formation on the affinity of integrin-ligand complexes.** *Biochemistry* 2004, **43**:2699-2707.
176. Wiesner S, Lange A, Fassler R: **Local call: from integrins to actin assembly.** *Trends in Cell Biology* 2006, **16**:327-329.
177. Su TL: **Micrococcin, an antibacterial substance formed by a strain of Micrococcus.** *Br J Exp Pathol* 1948, **29**:473-481.
178. Bagley MC, Dale JW, Merritt EA, Xiong X: **Thiopeptide antibiotics.** *Chem Rev* 2005, **105**:685-714.
179. Arndt H-DS, Sebastian; Baumann, Sascha; Ellinger, Bernhard: **Thiostrepton Derivatives.** US Patent WO 2009/115287 A1, 24.09.2009.
180. Schoof S, Baumann S, Ellinger B, Arndt HD: **A fluorescent probe for the 70 S-ribosomal GTPase-associated center.** *Chembiochem* 2009, **10**:242-245.
181. Conn GL, Draper DE, Lattman EE, Gittis AG: **Crystal structure of a conserved ribosomal protein-RNA complex.** *Science* 1999, **284**:1171-1174.
182. Ilin S, Hoskins A, Ohlenschlager O, Jonker HR, Schwalbe H, Wohnert J: **Domain reorientation and induced fit upon RNA binding: solution structure and dynamics of ribosomal protein L11 from *Thermotoga maritima*.** *Chembiochem* 2005, **6**:1611-1618.
183. Hinck AP, Markus MA, Huang S, Grzesiek S, Kustonovich I, Draper DE, Torchia DA: **The RNA binding domain of ribosomal protein L11: three-dimensional structure of the RNA-bound form of the protein and its interaction with 23 S rRNA.** *J Mol Biol* 1997, **274**:101-113.
184. Harms JM, Wilson DN, Schluenzen F, Connell SR, Stachelhaus T, Zaborowska Z, Spahn CM, Fucini P: **Translational regulation via L11: molecular switches on the ribosome turned on and off by thiostrepton and micrococcin.** *Mol Cell* 2008, **30**:26-38.
185. Xing Y, Draper DE: **Cooperative interactions of RNA and thiostrepton antibiotic with two domains of ribosomal protein L11.** *Biochemistry* 1996, **35**:1581-1588.
186. Jonker HR, Ilin S, Grimm SK, Wohnert J, Schwalbe H: **L11 domain rearrangement upon binding to RNA and thiostrepton studied by NMR spectroscopy.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:441-454.
187. Gartel AL: **FoxM1 inhibitors as potential anticancer drugs.** *Expert Opin Ther Targets* 2008, **12**:663-665.
188. Koc EC, Burkhart W, Blackburn K, Moyer MB, Schlatzer DM, Moseley A, Spremulli LL: **The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present.** *J Biol Chem* 2001, **276**:43958-43969.
189. Kustermans G, Piette J, Legrand-Poels S: **Actin-targeting natural compounds as tools to study the role of actin cytoskeleton in signal transduction.** *Biochem Pharmacol* 2008, **76**:1310-1322.

190. Sasse F, Kunze B, Gronewold TM, Reichenbach H: **The chondramides: cytostatic agents from myxobacteria acting on the actin cytoskeleton.** *J Natl Cancer Inst* 1998, **90**:1559-1563.
191. Gala F, D'Auria MV, De Marino S, Sepe V, Zollo F, Smith CD, Keller SN, Zampella A: **Jaspamides M-P: new tryptophan modified jaspamide derivatives from the sponge *Jaspis splendans*.** *Tetrahedron* 2009, **65**:51-56.
192. Kunze B, Jansen R, Sasse F, Hofle G, Reichenbach H: **Chondramides A approximately D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties.** *J Antibiot (Tokyo)* 1995, **48**:1262-1266.
193. Gala F, D'Auria MV, De Marino S, Sepe V, Zollo F, Smith CD, Copper JE, Zampella A: **Jaspamides H-L, new actin-targeting depsipeptides from the sponge *Jaspis splendans*.** *Tetrahedron* 2008, **64**:7127-7130.
194. Tannert R, Milroy LG, Ellinger B, Hu TS, Arndt HD, Waldmann H: **Synthesis and structure-activity correlation of natural-product inspired cyclodepsipeptides stabilizing F-actin.** *J Am Chem Soc* **132**:3063-3077.
195. Rocks O, Peyker A, Kahms M, Verveer PJ, Koerner C, Lumbierres M, Kuhlmann J, Waldmann H, Wittinghofer A, Bastiaens PI: **An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms.** *Science* 2005, **307**:1746-1752.
196. Brunsveld L, Kuhlmann J, Waldmann H: **Synthesis of palmitoylated Ras-peptides and -proteins.** *Methods* 2006, **40**:151-165.
197. Dekker FJ, Rocks O, Vartak N, Menninger S, Hedberg C, Balamurugan R, Wetzel S, Renner S, Gerauer M, Scholermann B, et al.: **Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling.** *Nat Chem Biol* **6**:449-456.
198. Gerauer MP: **Chemisch-biologischer Ansatz für die Protein-Semisynthese und biologische Evaluierung des N-Ras Zyklus.** Doktorarbeit. Technische Universität Dortmund: 2008.
199. Bader B, Kuhn K, Owen DJ, Waldmann H, Wittinghofer A, Kuhlmann J: **Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction.** *Nature* 2000, **403**:223-226.
200. Rocks O, Gerauer M, Vartak N, Koch S, Huang ZP, Pechlivanis M, Kuhlmann J, Brunsveld L, Chandra A, Ellinger B, et al.: **The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins.** *Cell* **141**:458-471.
201. Lajiness MS, Maggiora GM, Shanmugasundaram V: **Assessment of the consistency of medicinal chemists in reviewing sets of compounds.** *J Med Chem* 2004, **47**:4891-4896.
202. Schuffenhauer A, Brown N, Selzer P, Ertl P, Jacoby E: **Relationships between Molecular Complexity, Biological Activity, and Structural Diversity.** *J Chem Inf Model* 2006, **46**:525-535.
203. Holliday JD, Salim N, Whittle M, Willett P: **Analysis and display of the size dependence of chemical similarity coefficients.** *J Chem Inf Comput Sci* 2003, **43**:819-828.
204. Raymond JW, Blankley CJ, Willett P: **Comparison of chemical clustering methods using graph- and fingerprint-based similarity measures.** *J Mol Graph Model* 2003, **21**:421-433.

205. Engels MF, Venkatarangan P: **Smart screening: approaches to efficient HTS.** *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001, **4**:275-283.
206. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J: **Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America.** *Clin Infect Dis* 2009, **48**:1-12.
207. on World Wide Web URL: <http://www.dsmz.de/index.htm> (Besucht im Mai 2010)
208. De La Fuente R, Sonawane ND, Arumainayagam D, Verkman AS: **Small molecules with antimicrobial activity against E. coli and P. aeruginosa identified by high-throughput screening.** *Br J Pharmacol* 2006, **149**:551-559.
209. Strateva T, Yordanov D: **Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance.** *J Med Microbiol* 2009, **58**:1133-1148.
210. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, et al.: **Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium.** *Clin Microbiol Infect* 2007, **13**:560-578.
211. Hurdle JG, Yendapally R, Sun D, Lee RE: **Evaluation of analogs of reutericyclin as prospective candidates for treatment of staphylococcal skin infections.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**:4028-4031.
212. Fleming A: **On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929.** *Bull World Health Organ* 2001, **79**:780-790.
213. Wang J, Soisson SM, Young K, Shoop W, Kodali S, Galgoci A, Painter R, Parthasarathy G, Tang YS, Cummings R, et al.: **Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties.** *Nature* 2006, **441**:358-361.
214. Boehm HJ, Boehringer M, Bur D, Gmuender H, Huber W, Klaus W, Kostrewa D, Kuehne H, Luebbbers T, Meunier-Keller N, et al.: **Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening.** *J Med Chem* 2000, **43**:2664-2674.
215. Gmunder H, Kuratli K, Keck W: **Effect of pyrimido[1,6-a]benzimidazoles, quinolones, and Ca²⁺ on the DNA gyrase-mediated cleavage reaction.** *Antimicrob Agents Chemother* 1995, **39**:163-169.
216. Kulanthaivel P, Kreuzman AJ, Stregre MA, Belvo MD, Smitka TA, Clemens M, Swartling JR, Minton KL, Zheng F, Angleton EL, et al.: **Novel lipoglycopeptides as inhibitors of bacterial signal peptidase I.** *J Biol Chem* 2004, **279**:36250-36258.
217. Urban A, Eckermann S, Fast B, Metzger S, Gehling M, Ziegelbauer K, Rubsamens-Waigmann H, Freiberg C: **Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:6436-6443.
218. Hutter B, Fischer C, Jacobi A, Schaab C, Loferer H: **Panel of Bacillus subtilis reporter strains indicative of various modes of action.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:2588-2594.
219. Blount KF, Breaker RR: **Riboswitches as antibacterial drug targets.** *Nat Biotechnol* 2006, **24**:1558-1564.

220. Lee ER, Blount KF, Breaker RR: **Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression.** *RNA Biol* 2009, **6**:187-194.
221. Singh SB, Barrett JF: **Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products.** *Biochem Pharmacol* 2006, **71**:1006-1015.
222. Falconer SB, Brown ED: **New screens and targets in antibacterial drug discovery.** *Curr Opin Microbiol* 2009, **12**:497-504.
223. Conrad C, Erfle H, Warnat P, Daigle N, LÄ¶rcht T, Ellenberg J, Pepperkok R, Eils R: **Automatic Identification of Subcellular Phenotypes on Human Cell Arrays.** *Genome Research* 2004, **14**:1130-1136.
224. Rausch O: **High content cellular screening.** *Curr Opin Chem Biol* 2006, **10**:316-320.
225. Pepperkok R, Ellenberg J: **High-throughput fluorescence microscopy for systems biology.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:690-696.
226. Borchert KM, Galvin RJ, Frolik CA, Hale LV, Halladay DL, Gonyier RJ, Trask OJ, Nickischer DR, Houck KA: **High-content screening assay for activators of the Wnt/Fzd pathway in primary human cells.** *Assay Drug Dev Technol* 2005, **3**:133-141.
227. Yarrow JC, Totsukawa G, Charras GT, Mitchison TJ: **Screening for cell migration inhibitors via automated microscopy reveals a Rho-kinase inhibitor.** *Chem Biol* 2005, **12**:385-395.
228. Nusse R: **Cell biology: relays at the membrane.** *Nature* 2005, **438**:747-749.
229. Lee E, Salic A, Kruger R, Heinrich R, Kirschner MW: **The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway.** *PLoS Biol* 2003, **1**:E10.
230. Mirams GR, Byrne HM, King JR: **A multiple timescale analysis of a mathematical model of the Wnt/beta-catenin signalling pathway.** *J Math Biol* **60**:131-160.
231. Heuberger J, Birchmeier W: **Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical wnt signaling.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:a002915.
232. Nelson WJ, Nusse R: **Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways.** *Science* 2004, **303**:1483-1487.
233. Bonvini P, An WG, Rosolen A, Nguyen P, Trepel J, Garcia de Herreros A, Dunach M, Neckers LM: **Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant beta-catenin in melanoma cells, increases beta-catenin-E-cadherin association, and decreases beta-catenin-sensitive transcription.** *Cancer Res* 2001, **61**:1671-1677.
234. Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, Skeel A, Nakaigawa N, Zbar B, Leonard EJ: **Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the beta-catenin pathway.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:5857-5868.
235. George SJ: **Wnt pathway: a new role in regulation of inflammation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, **28**:400-402.
236. Kaler P, Augenlicht L, Klampfer L: **Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3.** *Oncogene* 2009, **28**:3892-3902.
237. Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R, Logtenberg T, Clevers H: **Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1.** *Science* 1999, **285**:1923-1926.

238. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F: **Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:1172-1183.
239. Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Munoz A: **The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer.** *Oncogene* 2005, **24**:1098-1103.
240. Novak A, Dedhar S: **Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf.** *Cell Mol Life Sci* 1999, **56**:523-537.
241. Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Puder M, Daley GQ, Moon RT, et al.: **Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration.** *Cell* 2009, **136**:1136-1147.
242. Chan TA: **Prostaglandins and the colon cancer connection.** *Trends Mol Med* 2006, **12**:240-244.
243. Nguyen SP, Bent S, Chen YH, Terdiman JP: **Gender as a Risk Factor for Advanced Neoplasia and Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009.
244. Hendifar A, Yang D, Lenz F, Lurje G, Pohl A, Lenz C, Ning Y, Zhang W, Lenz HJ: **Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:6391-6397.
245. Varea O, Garrido JJ, Dopazo A, Mendez P, Garcia-Segura LM, Wandosell F: **Estradiol activates beta-catenin dependent transcription in neurons.** *PLoS One* 2009, **4**:e5153.
246. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, et al.: **Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo.** *J Biol Chem* 2004, **279**:40255-40258.
247. Terry S, Yang X, Chen MW, Vacherot F, Buttyan R: **Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer.** *J Cell Biochem* 2006, **99**:402-410.
248. Ulloa F, Itasaki N, Briscoe J: **Inhibitory Gli3 activity negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling.** *Curr Biol* 2007, **17**:545-550.
249. Yazawa S, Umesono Y, Hayashi T, Tarui H, Agata K: **Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:22329-22334.
250. Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, Robert-Moreno A, Fernandez-Majada V, Grilli A, Lopez-Bigas N, Bellora N, Alba MM, Torres F, et al.: **Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:6315-6320.
251. Zhou J, Cheng P, Youn JI, Cotter MJ, Gabrilovich DI: **Notch and wingless signaling cooperate in regulation of dendritic cell differentiation.** *Immunity* 2009, **30**:845-859.
252. Yi F, Sun J, Lim GE, Fantus IG, Brubaker PL, Jin T: **Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells.** *Endocrinology* 2008, **149**:2341-2351.
253. Jin T: **The WNT signalling pathway and diabetes mellitus.** *Diabetologia* 2008, **51**:1771-1780.

254. Sun J, Khalid S, Rozakis-Adcock M, Fantus IG, Jin T: **P-21-activated protein kinase-1 functions as a linker between insulin and Wnt signaling pathways in the intestine.** *Oncogene* 2009, **28**:3132-3144.
255. Ng SS, Mahmoudi T, Danenberg E, Bejaoui I, de Lau W, Korswagen HC, Schutte M, Clevers H: **Phosphatidylinositol 3-kinase signaling does not activate the wnt cascade.** *J Biol Chem* 2009, **284**:35308-35313.
256. Bikkavilli RK, Malbon CC: **Mitogen-activated protein kinases and Wnt/beta-catenin signaling: Molecular conversations among signaling pathways.** *Commun Integr Biol* 2009, **2**:46-49.
257. Yun MS, Kim SE, Jeon SH, Lee JS, Choi KY: **Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation.** *J Cell Sci* 2005, **118**:313-322.
258. Kim D, Rath O, Kolch W, Cho KH: **A hidden oncogenic positive feedback loop caused by crosstalk between Wnt and ERK pathways.** *Oncogene* 2007, **26**:4571-4579.
259. Ji H, Wang J, Nika H, Hawke D, Keezer S, Ge Q, Fang B, Fang X, Fang D, Litchfield DW, et al.: **EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin.** *Mol Cell* 2009, **36**:547-559.
260. Labbe E, Letamendia A, Attisano L: **Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:8358-8363.
261. Hussein SM, Duff EK, Sirard C: **Smad4 and beta-catenin co-activators functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded expression of Msx2.** *J Biol Chem* 2003, **278**:48805-48814.
262. Joen-Rong S: **Pharmacological Effects of Rutaecarpine, an Alkaloid Isolated from *Evodia rutaecarpa*.** *Cardiovascular Drug Reviews* 1999, **17**:237-245.
263. Jia S, Hu C: **Pharmacological Effects of Rutaecarpine as a Cardiovascular Protective Agent.** *Molecules* **15**:1873-1881.
264. Heo SK, Yun HJ, Yi HS, Noh EK, Park SD: **Evodiamine and rutaecarpine inhibit migration by LIGHT via suppression of NADPH oxidase activation.** *J Cell Biochem* 2009, **107**:123-133.
265. Maruyama W, Sango K, Iwasa K, Minami C, Dostert P, Kawai M, Moriyasu M, Naoi M: **Dopaminergic neurotoxins, 6,7-dihydroxy-1-(3', 4'-dihydroxybenzyl)-isoquinolines, cause different types of cell death in SH-SY5Y cells: apoptosis was induced by oxidized papaverolines and necrosis by reduced tetrahydropapaverolines.** *Neurosci Lett* 2000, **291**:89-92.
266. Grollman AP: **Structural Basis for Inhibition of Protein Synthesis by Emetine and Cycloheximide Based on an Analogy between Ipecac Alkaloids and Glutarimide Antibiotics.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966, **56**:1867-1874.
267. Yang WC, Dubick M: **Mechanism of emetine cardiotoxicity.** *Pharmacol Ther* 1980, **10**:15-26.
268. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW: **Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.** *Science* 1997, **275**:1787-1790.

269. Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, Hill DE, Markowitz S, Willson JK, Paraskeva C, Petersen GM, Hamilton SR, Vogelstein B, et al.: **The APC gene product in normal and tumor cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:2846-2850.
270. Arndt HD: **Small molecule modulators of transcription.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2006, **45**:4552-4560.
271. Guiffant D, Tribouillard D, Gug F, Galons H, Meijer L, Blondel M, Bach S: **Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography.** *Biotechnol J* 2007, **2**:68-75.
272. Knockaert M, Lenormand P, Gray N, Schultz P, Pouyssegur J, Meijer L: **p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol.** *Oncogene* 2002, **21**:6413-6424.
273. Shiyama T, Furuya M, Yamazaki A, Terada T, Tanaka A: **Design and synthesis of novel hydrophilic spacers for the reduction of nonspecific binding proteins on affinity resins.** *Bioorg Med Chem* 2004, **12**:2831-2841.
274. Zhang Q, Major MB, Takanashi S, Camp ND, Nishiya N, Peters EC, Ginsberg MH, Jian X, Randazzo PA, Schultz PG, et al.: **Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:7444-7448.
275. Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, Nishi T, Sato I, Hiramoto M, Aizawa S, Hatakeyama M, Ohba R, Hatori H, et al.: **High-performance affinity beads for identifying drug receptors.** *Nat Biotechnol* 2000, **18**:877-881.
276. Sato S, Kwon Y, Kamisuki S, Srivastava N, Mao Q, Kawazoe Y, Uesugi M: **Polyproline-rod approach to isolating protein targets of bioactive small molecules: isolation of a new target of indomethacin.** *J Am Chem Soc* 2007, **129**:873-880.
277. Arora PS, Ansari AZ, Best TP, Ptashne M, Dervan PB: **Design of artificial transcriptional activators with rigid poly-L-proline linkers.** *J Am Chem Soc* 2002, **124**:13067-13071.
278. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS: **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.** *Electrophoresis* 1999, **20**:3551-3567.
279. McHugh L, Arthur JW: **Computational methods for protein identification from mass spectrometry data.** *PLoS Comput Biol* 2008, **4**:e12.
280. Allende ML, Amsterdam A, Becker T, Kawakami K, Gaiano N, Hopkins N: **Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development.** *Genes Dev* 1996, **10**:3141-3155.
281. Gessert S, Maurus D, Rossner A, Kuhl M: **Pescadillo is required for *Xenopus laevis* eye development and neural crest migration.** *Dev Biol* 2007, **310**:99-112.
282. Lerch-Gaggl A, Haque J, Li J, Ning G, Traktman P, Duncan SA: **Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation.** *J Biol Chem* 2002, **277**:45347-45355.
283. Kinoshita Y, Jarell AD, Flaman JM, Foltz G, Schuster J, Sopher BL, Irvin DK, Kanning K, Kornblum HI, Nelson PS, et al.: **Pescadillo, a novel cell cycle regulatory protein abnormally expressed in malignant cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**:6656-6665.

284. Killian A, Le Meur N, Sesboue R, Bourguignon J, Bougeard G, Gautherot J, Bastard C, Frebourg T, Flaman JM: **Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability.** *Oncogene* 2004, **23**:8597-8602.
285. Draetta G, Beach D: **Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement.** *Cell* 1988, **54**:17-26.
286. Salaun P, Rannou Y, Prigent C: **Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards.** *Adv Exp Med Biol* 2008, **617**:41-56.
287. Adler M, Muller K, Rached E, Dekant W, Mally A: **Modulation of key regulators of mitosis linked to chromosomal instability is an early event in ochratoxin A carcinogenicity.** *Carcinogenesis* 2009, **30**:711-719.
288. Davidson G, Shen J, Huang YL, Su Y, Karaulanov E, Bartscherer K, Hassler C, Stannek P, Boutros M, Niehrs C: **Cell cycle control of wnt receptor activation.** *Dev Cell* 2009, **17**:788-799.
289. Taylor J, Abramova N, Charlton J, Adler PN: **Van Gogh: a new Drosophila tissue polarity gene.** *Genetics* 1998, **150**:199-210.
290. Torban E, Patenaude AM, Leclerc S, Rakowiecki S, Gauthier S, Andelfinger G, Epstein DJ, Gros P: **Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:3449-3454.
291. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** *J Gen Virol* 1977, **36**:59-74.
292. Katoh Y, Katoh M: **Comparative genomics on Vangl1 and Vangl2 genes.** *Int J Oncol* 2005, **26**:1435-1440.
293. Katoh M: **Strabismus (STB)/Vang-like (VANGL) gene family (Review).** *Int J Mol Med* 2002, **10**:11-15.
294. Jessen JR, Solnica-Krezel L: **Identification and developmental expression pattern of van gogh-like 1, a second zebrafish strabismus homologue.** *Gene Expr Patterns* 2004, **4**:339-344.
295. Torban E, Wang HJ, Patenaude AM, Riccomagno M, Daniels E, Epstein D, Gros P: **Tissue, cellular and sub-cellular localization of the Vangl2 protein during embryonic development: effect of the Lp mutation.** *Gene Expr Patterns* 2007, **7**:346-354.
296. Mullick A, Trasler D, Gros P: **High-resolution linkage map in the vicinity of the Lp locus.** *Genomics* 1995, **26**:479-488.
297. Kibar Z, Underhill DA, Canonne-Hergaux F, Gauthier S, Justice MJ, Gros P: **Identification of a new chemically induced allele (Lp(m1Jus)) at the loop-tail locus: morphology, histology, and genetic mapping.** *Genomics* 2001, **72**:331-337.
298. Park M, Moon RT: **The planar cell-polarity gene stbm regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:20-25.
299. Chan DW, Chan CY, Yam JW, Ching YP, Ng IO: **Prickle-1 negatively regulates Wnt/beta-catenin pathway by promoting Dishevelled ubiquitination/degradation in liver cancer.** *Gastroenterology* 2006, **131**:1218-1227.

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADMET	Absorbtion, Distribution, Metabolismus, Exkretion, Toxizität
APS	Ammonium-Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovine Serum Albumin
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ED ₅₀ -Wert	Evective Dose 50%
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced grenn fluorescent protein
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ESI	Electrospay-Ionisation
FCS	fötales Kälberserum
FDA	Federal drug administration
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N#-2-ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometry

IC ₅₀ -Wert	Inhibitory concentration 50%
IDSA	Infectious diseases society of america
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
Kap.	Kapitel
MAKP	Mitogen activated protein kinase
MIC-Wert	Minimal inhibitory concentration
min	Minute
NCI	National Cancer Institute
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
Pipes	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WST	Water soluble tetrazolium
z. B.	Zum Beispiel

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Ein- oder Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1517 und 1525).

11. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Herbert Waldmann für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen und insbesondere für die Freiheiten bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Prof. Dr. Roger Goody möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Dr. Leif Dehmelt möchte ich ebenfalls herzlich für die Übernahme der Prüfungspflichten danken.

Dr. O. Müller danke ich für die Betreuung und Aufnahme in seine Gruppe in der Anfangsphase dieser Arbeit sowie für die Einführung in den Wnt-Signalweg. Dr. H.-D. Arndt danke ich für die Betreuung in der Schlussphase dieser Arbeit und für seine Bereitschaft zu kritischen Diskussionen zu jeder Zeit.

Ich danke den Korrektoren dieser Arbeit, Dr. Sonja Sievers, Verena Pries und ganz besonders Martin Köhler, da ihre Anmerkungen die vorliegende Arbeit ganz wesentlich verbessert haben.

Ich möchte mich bei all den Kooperationspartnern bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben, besonders bei K. Wittstein für ihre Versuche, SR56 zu synthetisieren und die Struktur aufzuklären, Dr. S. Wetzel für die entscheidende Hilfe bei der Erstellung der Substanzauswahl und auch bei einer Vielzahl anderer Computerprobleme, Dr. C. Derave und Dr. S. Rizzo für Synthesen im Oxepan-Projekt, Dr. H. Schröder, Dr. G. Triola, S. Schoof, Dr. S. Koch und Dr. L.-G. Milroy für Arbeiten, die mit Veröffentlichungen gekrönt wurden, Prof. Dr. I. Guerrero für die lehrreichen Tage am CBM Severo Ochoa.

Dr. R. Seidel, A. Reulen und dem ganzen Labor B 2.12 danke ich, dass sie mir meine Antibiotika-Untersuchungen in ihrer Mitte ermöglicht haben. Dr. S. Menninger, V. Pries und Dr. K. Warburg danke ich für ihre Hilfe im Laboralltag, Dr. T. Knoth, Dr. T. Walther, Dr. D. Weinrich, Y. He und Dr. H. Sun für die Synthese verschiedener Substanzen und die Hilfe bei chemischen Fragestellungen. B. Schölermann danke ich von Herzen für ihren stetigen Kampf gegen das Chaos.

11. Danksagung

Es ist leider nicht möglich all den netten Menschen zu danken, die ich in den letzten Jahren getroffen habe und ohne die die Zeit am MPI nicht so schön gewesen wäre. Jedoch möchte ich Sascha, Karin, Thilo, Stefan, Tobias und Anja besonders danken, mit denen ich auch neben der Forschung viel unternommen habe.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie!

12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, 8. Juni 2010

Bernhard Ellinger